DIE PYRROLIZIDINALKALOIDE AUS SENECIO RUPESTRIS WALDST. U. KIT., SENECIO PALUDOSUS, SSP TOMENTOSUS L. UND SENECIO DORIA L.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

ANDREA PFITZER

aus

OBERHAUSEN

BONN 1986

DIE PYRROLIZIDINALKALOIDE AUS SENECIO RUPESTRIS WALDST. U. KIT., SENECIO PALUDOSUS, SSP TOMENTOSUS L. UND SENECIO DORIA L.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem. -Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

ANDREA PFITZER

aus

OBERHAUSEN

BONN 1986

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. E. Röder
2. Referent: Prof. Dr. G. Rücker

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 1986

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Meinen Eltern und
Erwin
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.0	Einleitung	6
1.1	Historischer Überblick	6
1.2	Chemie und Toxikologie der Pyrrolizidinalkaloide	10
2.0	Senecio rupestris	16
2.1	Botanische Beschreibung	16
2.2	Phytochemische Beschreibung	17
2.2.1	Extraktion	17
2.2.2	Nachweis der Alkaloide	18
2.2.3	Isolierung	20
2.3	Strukturaufklärung	21
2.3.1	Identifizierung des Alkaloidgemisches 1	21
2.3.2	Isomerentrennung	33
2.3.2.1	GC - Analyse	33
2.3.2.2	Säulenchromatographie	33
2.4	Synthese eines Metaboliten von Alkaloid 1	38
2.4.1	Oxidationsmittel Monoperphthalsäure	38
2.4.2	Oxidationsmittel m - Chlorperbenzoesäure	39

3.0	Senecio paludosus, ssp tomentosus	43
3.1	Botanische Beschreibung	43
3.2	Phytochemische Beschreibung	44
3.2.1	Extraktion	44
3.2.2	Nachweis der Alkaloide	44
3.2.3	Auftrennung und Isolierung	44
3.3	Strukturaufklärung des Alkaloid-gemisches 2	47
4.0	Senecio doria	60
4.1	Botanische Beschreibung	60
4.2	Phytochemische Beschreibung	61
4.2.1	Extraktion	61
4.2.2	Nachweis des Alkaloids	61
4.2.3	Auftrennung und Isolierung	61
4.3	Strukturaufklärung des Alkaloids 3	62
4.4	Quantitative Bestimmung des Alkaloids unter Standortberücksichtigung	73
5.0	Zusammenfassung	76
6.0	Experimenteller Teil	77
7.0	Literaturverzeichnis	83

1.0 Einleitung

1.1 Historischer Überblick

Die Gattung Senecio aus der Familie der Asteraceen (Compositae) ist mit weit über 1200 Arten in der ganzen Welt verbreitet.

Schon im vierten Jahrhundert vor Christus wird Kreuzkraut von Theophrast, einem Schüler Aristoteles, unter dem Namen "Erigeron" erwähnt. Dioscorides beschreibt im ersten Jahrhundert nach Christus die Anwendung von Blüten und Blättern verschiedener Senecioarten bei Entzündungen und Geschwüren. Unter der Bezeichnung "Herba consolidae sarracenicae" fand sie Eingang in die Apothekentaxen von Straßburg (1563, 1571, 1595) sowie in die Pharmakopoeen von Freiburg 1607 und Mannheim 1767 /1/. Tabernaemontanus (1613) setzte die oberirdischen Teile der Pflanze in der Frauenheilkunde ein /2/.

Auch in der heutigen Zeit finden Senecio aureus in der Zahnheilkunde und Senecio fuchsii in der Gynäkologie noch Anwendung /3, 4, 5, 6/. Ebenso werden verschiedene Tees, die Senecioarten enthalten, für die unterschiedlichsten Indikationsgebiete eingesetzt.

Die phytochemische Erforschung der Inhaltsstoffe begann Anfang des 20. Jahrhunderts. Man entdeckte, daß Kreuzkrautarten Alkaloide enthalten. Watt isolierte 1909 erstmals diesen Alkaloidtyp aus dem Rohextrakt von Senecioarten /7/. Diese

/1/ A. Müller; Heil- und Gewürzpflanzen 7, 8 (1924)
/2/ Neu vollkommentlich Kreuterbuch des J. T. Tabernaemontanus, Hoffermann Frankfurt S. 477 (1612)
/3/ E. Schmidt; Zahnärztl. Praxis 4, 16 (1953)
/4/ W. Klatt; Zahnärztl. Rundschau 62, 20 (1953)
/5/ E. Röder; Nebenwirkungen v. Heilpflanzen Dtsch. Apoth. Ztg. 22, 41 (1982)
/6/ B. Manstein; Zentralbibl. Gynaekol. 42, 1672 (1953)
/7/ H.F. Watt; J. Chem. Soc. 95, 466 (1909)

Senecioalkaloide werden auf Grund ihrer Struktur auch Pyrrolizidinalkaloide genannt. Dieser Alkaloidtyp ist jedoch nicht nur auf Senecioarten beschränkt, sondern man findet ihn in Vertretern verschiedener Pflanzenfamilien wieder, so z.B. in einigen Ligularia- und Gynuraarten (Asteraceae), in Crotalaria und Cytisus (Fabaceae) und in den meisten Boraginaceen, vorwiegend in den Gattungen Heliotropium, Amsinckia, Echium, Cynoglossum und Trichodesma /8, 9, 10, 11/.

Anlaß für genauere phytochemische Untersuchungen waren dramatisch verlaufende Weideviehvergiftungen zu Beginn dieses Jahrhunderts. Die Vergiftung ist in Kanada, Südafrika, Nebraska und Deutschland unter mehreren Namen bekannt so z.B. als "Pictou" /12/, "Molteno-Krankheit" /13/, "walking disease" /14/, bzw. "Schweinsberger Krankheit" /15/. Bei den betroffenen Tieren führten neben akuten toxischen Reaktionen, vornehmlich Lebererkrankungen bzw. Leberzirrhosen zum Tod. Gezielte Fütterungsversuche mit isolierten Alkaloiden bestätigten, daß diese für die Vergiftungen verantwortlich sind /16/. Obwohl blühende Pflanzen der oben genannten Arten normalerweise vom

/8/ L.B. Bull, C.C.J. Culvenor, A.T. Dick; The Pyrrolizidine Alkaloids North Holland Company, Amsterdam (1968)
/9/ E. Röder; Pharm. Unserer Zeit 13, 2 (1984)
/10/ L.W. Smith, C.C.J. Culvenor; J. Natural Products 44, 2 (1981)
/11/ D.J. Robins; In Progress of the Chemistry of Organic Products Founded by L. Zechmeister Ed. W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby Springer Verlag Wien u. New York Vol. 41, 115ff (1982)
/12/ W.H. Pethick; Rept. Vet. Director General Dep. Agri. for 1905 Can. 90 (1906)
/13/ W.H. Chase; Agri. J. Cape Good Hope 25, 675 (1904)
/14/ L. Van Es, J.R. Cantwell, H.M. Martin, J. Kramer; Agri. Exptl. Station Res. Bull 43 (1929)
/15/ A.R. Cushny; J. Pharmacol. Exp. Ther. 2, 531 (1911)
/16/ D.R. Svoboda, J.K. Reddy; Cancer Res. 32, 908 (1972)

Weidevieh gemieden werden, kommt es über kontaminiertes Winterfutter immer wieder zu Vergiftungen bei Pferden, Schweinen und Geflügel /17, 18, 19/.

So berichtete die Schweizer Gesellschaft für Pathologie 1981 über Leberzirrhosen bei Schlachtvieh. Dies konnte auf den Genuß von Senecio alpinus zurückgeführt werden /20/.

Aber nicht nur für Weidevieh, sondern auch für den Menschen stellen pyrrolizidinhaltige Pflanzen eine Gefährdung dar /21, 22/. So ist über Vergiftungen mit zum Teil epidemischem Ausmaß aus Afghanistan, Indien und Jamaika in den siebziger Jahren berichtet worden /23, 24, 25/. Der Genuß von kontaminiertem Getreide und der Einsatz von Kreuzkraut als Arzneimittel in verschiedenen Darreichungsformen stellt noch heute in weiten Teilen der USA ein enormes Problem dar /26, 27, 28/. Die dadurch verursachten Erkrankungen sind häufig irreversibel und führen

/17/ P. N. Harris, K. K. Chen; Cancer Res. 30, 2881 (1970)
/18/ P. T. Hooper, W. A. Scanlan; Aust. Vet. J. 53, 109 (1977)
/19/ D. A. Passll, G. G. Hogg, R. G. Russel, J. A. Edgar, J. M. Tence, L. Rikard-Bell; Aust. Vet. J. 55, 284 (1979)
/20/ Schweiz. Gesellschaft für Pathologie (Vereinsbericht 1980); Schweiz. Med. Wochenschr. 111, 908 (1981)
/21/ E. K. Mc Lean; Pharmacol. Rev. 22, 429 (1970)
/22/ R. Huxtable, A. Stillman, D. Ciaramitaro; Proc. West. Pharmacol. Soc. 19, 181 (1977)
/23/ H. D. Tandon, B. N. Tandon, A. R. Mattocks; Am. J. Gastroenterol. 70, 607 (1978)
/24/ G. Bras, D. B. Jellilife, K. L. Stuart; Arch. Pathol. 57, 285 (1954)
/25/ B. N. Tandon, R. K. Tandon, J. N. Tandon, M. Narndranathan, Y. K. Joshi; Lancet 7, 271 (1976)
/26/ A. E. Johnson, J. R. Molyneux, G. B. Merril; J. Agric. Food Chem. 33, 50 (1985)
/27/ A. Stillman, A. R. Huxtable, P. Consroe, P. Kohnen, S. Smith; Gastroenterlogy 73, 349 (1977)
/28/ J. N. Roitman; Lancet 25, 944 (1981)

in vielen Fällen zum Tod /29/.

Auch eine indirekte Aufnahme von Pyrrolizidinalkaloiden bedeutet eine Humangefährdung. Über die Nahrungskette werden Alkaloide von Tieren, die pyrrolizidinhaltige Pflanzen in größeren Mengen gefressen haben, vom Menschen aufgenommen. So wurden Alkaloide z.B. in Honig und Milch nachgewiesen /30, 31, 32, 33/.

In den Industrieländern ist der Trend zu beobachten, daß die traditionellen Heilmethoden gegenüber den synthetischen Arzneimitteln immer mehr an Attraktivität gewinnen. Die Anwendung sogenannter "natürlicher Heilmittel", worunter galenische Zubereitungen aus Pflanzen, Pflanzenteilen und Extrakten zu verstehen sind, verstärkt sich zusehends. Sie gelten als angeblich nebenwirkungsfrei und ungefährlich. Eine Selbstmedikamentation über einen langen Zeitraum ist nichts Ungewöhnliches. Dabei ist aber zu bedenken, daß Drogen oder ihre galenischen Zubereitungen über kürzen Zeitraum eingenommen nebenwirkungsfrei sein können. Bei Langzeit- oder Daueranwendung dieser sogenannten "Mitepharmaka" kann es dagegen zu Nebenwirkungen kommen /5/. Diese Situation trifft auch auf einige pyrrolizidinhaltige Pflanzen zu. Die in ihnen enthaltene Alkaloidkonzentration ist häufig kleiner als ein Prozent, aber sie stellen meistens nicht nur toxische sondern sogar kanzerogene und mutagene Agentien dar. Bei Anwendung über einen längeren Zeitraum können daher die angeführten Intoxikationen auftreten.

/29/ R.J. Huxtable; Gen. Pharmacol. 10, 159 (1979)

/30/ M.L. Deinzer, P.A. Thomson, D.M. Burgett, D.L. Isaacson; Science (Washington) 195, 497 (1977)

/31/ J.O. Dickinson, M.P. Cooke, R.R. King, P.A. Mohamed; J. Am. Vet. Med. Ascoc. 169, 1192 (1976)

/32/ M.L. Deinzer, B.L. Arbogast, D.R. Buhler, P.R. Cheeke; Anal. Chem. 54, 1811 (1982)

/33/ A.E. Johnson; Am. J. Vet. Res. 37, 107 (1976)

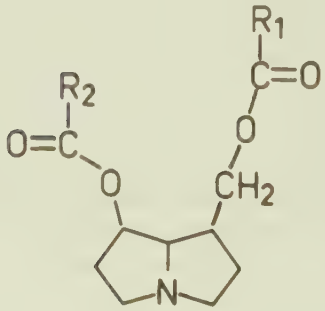
1.2 Chemie und Toxikologie der Pyrrolizidinalkaloide

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind hauptsächlich Esteralkaloide, deren Grundkörper, Necin genannt, ein bicyclisches über Stickstoff verknüpftes Fünf-Ring-System mit zwei bis drei alkoholischen Gruppen bildet. Diese Aminoalkohole können mit Mono- bzw. Dicarbonsäuren verestert sein /34/.

Die Pyrrolizidinalkaloide werden in drei Gruppen eingeteilt:

1) PA ohne eine Doppelbindung im Necinteil.

Sie leiten sich vom Platinecin oder Hastanecin ab und gelten als untoxisch /35/.

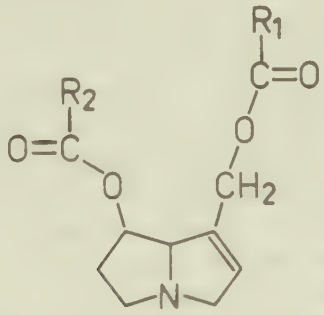


/34/ R. Adams, T.R. Govindachari;
J. Am. Chem. Soc. 71, 1180 (1949)

/35/ A.R. Mattocks; Chem. Biol. Interact. 5, 227 (1972)

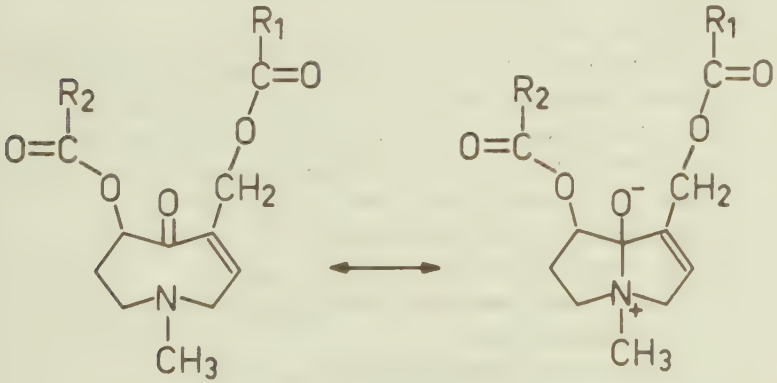
2) PA mit einer Doppelbindung in 1, 2 - Stellung im Necinteil.

Sie leiten sich vom Retronecin oder Heliotridin ab und gelten als toxisch /36/.



3) PA des Otonecintyps, die im Necinteil ebenfalls eine Doppelbindung enthalten.

Darüber hinaus ist der Stickstoff methyliert und C-8 weist eine Ketofunktion auf. Sie gelten ebenfalls als toxisch.



/36/ R. Schoental; Nature (London) 179, 361 (1957)

Schoental entdeckte, daß nicht die Alkaloide selbst, sondern ihre Metabolite toxisch sind /36/. Hierbei handelt es sich normalerweise um bifunktionelle Pyrrole, die aus den in der Leber gebildeten N-Oxide entstehen /37/. Die Metabolisierung von PA nach Mattocks /38/ und Culvenor /39/ in der Version von Röder /9/, in die auch die Otonecin - Alkaloide einbezogen wurden, zeigt Abb. 1.

Bei diesen Pyrrolderivaten kommt es auf Grund der Mesomerie zum freien Elektronenpaar des Stickstoffs leicht zur Esterspaltung und Weiterreaktion mit nucleophilen Verbindungen z.B. Thiolen, Aminen, Proteinen oder den Purin- bzw. Pyrimidinbasen der DNS/RNS entsprechend einer SN2 - Reaktion. Bei Diestern werden beide Estergruppen aktiviert, die schnell mit Nucleophilen reagieren /38/.

Nicht veresterte Pyrrolderivate können ebenfalls mit Nucleophilen reagieren allerdings wesentlich langsamer /40/. Alle angeführten Metabolisierungsschritte laufen in der Leber ab, so daß dieses Organ das Hauptziel der toxischen Nebenwirkungen ist. Sie führen zu venoocclusiven Veränderungen, Leberzirrhosen, Megalocytosen, Hyperplasien, die in Adenome und Karzinome übergehen können /41, 9/.

Daneben können die genannten Pyrrolderivate über den

/37/ C.C.J. Culvenor, J.A. Edgar, L.W. Smith, M.V. Jago, J.E. Peterson; Nature (London) New Biol. 229, 255 (1971)

/38/ A.R. Mattocks; Nature (London) 217, 723 (1968)

/39/ C.C.J. Culvenor, M.V. Jago; Carcinogenic Plant Products and DNA in "Chemical Carcinogens and DNA" (Ed. P.L. Grover) Vol. 1, 161 (1979) CRC Press, Boca Raton, Florida

/40/ A.R. Mattocks; Phytochemical Ecology Ed. J.B. Harborne; Annual Proceeding of the Phytochemical Society Nr. 8, 179 ff Academic Press London and New York (1972)

/41/ M. Lafranconi, R.J. Huxtable; Rev. Drug Metabol. Drug Interact. 3, 271 (1981)

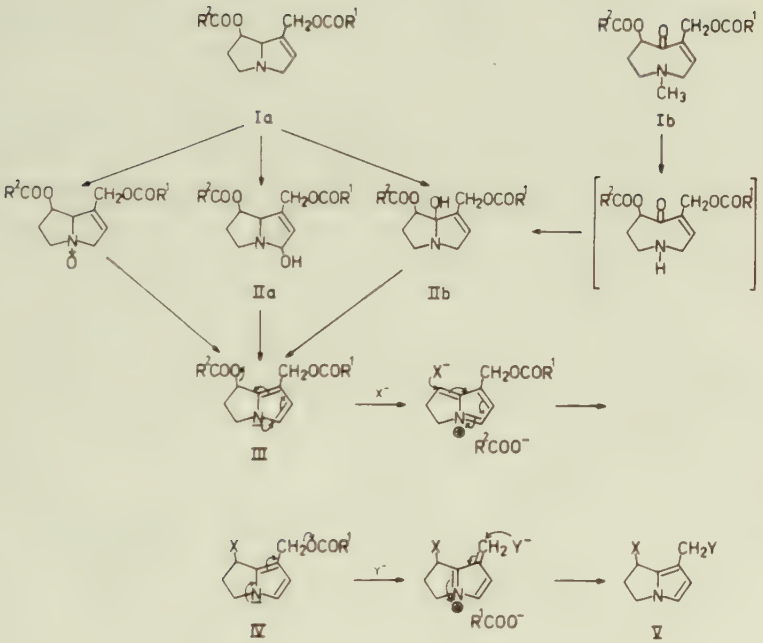
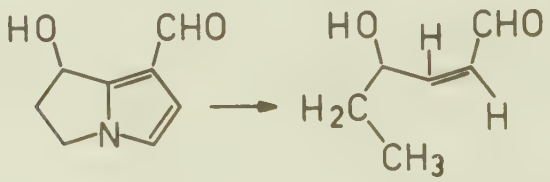


Abb. 1 Metabolisierungsschema nach Mattocks und Culvenor in der Version von Röder

Blutkreislauf zu anderen Zielorganen gelangen, wodurch ebenfalls Intoxikationen durch PA an Lunge, Herz und Niere beobachtet werden /40, 42/. Gelangen die Metaboliten in die Blutbahn, können sie Lungenschäden in Form von pulmonal- arteriellen Hypertensien hervorrufen. die ein akutes Rechtsversagen zur Folge haben (cor pulmonale) /41, 9/. Durch Ausscheidung über die Niere können Blasentumore entstehen /9/.

Zur Metabolisierung ist somit das Vorhandensein einer Doppelbindung in 1, 2 - Stellung des Necinteils sowie mindestens einer Esterbindung Voraussetzung. Monoester sind akuttoxisch. Diester gelten als wesentlich toxischer. Sie zeigen karzinogene, mutagene und teratogene Eigenschaften /43, 29/.

Abweichend von dieser bicyclischen Ringstruktur isolierten Segall und Mitarbeiter einen aliphatischen Metaboliten. Sie vermuten, daß das Pyrrolderivat Danaidal zum t - 4 Hydroxy - 2 hexenal metabolisiert wird. Von diesem Aliphaten wird angenommen, daß er zu Leberschäden führt /44/.



Danaidal t-4Hydroxy-2hexenal

/42/ C.C.J. Culvenor, L.W. Smith;
Tetrahedron Lett. 41, 3603 (1969)

/43/ J.O. Dickinson;
Food and Drug Administration (Washington)
Bur. Vet. Med. FDA/BVM Bd. 132, 45ff (1980)

/44/ H.J. Segall, D.W. Wilson, J.L. Dallas, W.F. Haddon;
Science 229, 472 (1985)

Zur Abschätzung der eventuell vorhandenen Risiken ist es daher von Interesse, über die phytochemische Zusammensetzung von solchen Pflanzen Kenntnis zu besitzen, die Pyrrolizidinalkaloide enthalten können. Diese Situation trifft auf die Pflanzen Senecio rupestris, Senecio doria sowie Senecio paludosus, ssp tomentosus zu, die verbreitet in alpinen Gebieten, auf Weide- und Nutzflächen vorkommen. Da über eventuell vorhandene alkaloidische Inhaltsstoffe noch nichts bekannt war, sollte eine phytochemische Bearbeitung Aussagen über deren alkaloidische Inhaltsstoffe und Struktur erbringen.

2.0 Senecio rupestris Waldst. u. Kit.

2.1 Botanische Beschreibung und Fundort

Die Asteracee Senecio rupestris, Felsen - Kreuzkraut, ist eine 20 - 60 cm hohe Pflanze mit einer walzenförmigen, knotigen, schiefliegenden Grundachse. Der aufrechte Stengel ist etwas gerillt und kahl, die fiederspaltigen Laubblätter weisen längliche, ungleichmäßig gezähnte Abschnitte auf. Oberseits können sie später verkahlen, unterseits sind sie dagegen durch Gliederhaare flockig. Die 2 - 3 cm breiten Blütenköpfchen bilden eine lockere, unregelmäßig verzweigte Trugdolde Die 12 mm lange Hülle ist mit sehr viel kürzeren Außenhüllblättern umgeben. Die 21 Hüllblätter sind schmal-linear zugespitzt und kahl. Ihre hellgelben Blüten sind je mit dreizehn Zungenblüten bestückt. Die Früchte sind längsgerieft, walzlich und leicht behaart. Der Pappus wird zur Fruchtzeit doppelt so lang wie die Frucht.

Senecio rupestris wächst an kiesigen, steinigen oder kalkhaltigen Orten, wie z. B auf buschigen Hängen, in lichten Wäldern, an alten Mauern, an Straßenrändern und Holzschlägen. Sie ist hauptsächlich in der östlichen Schweiz, in Österreich, Bayern, und im Apennin von der Bergstufe bis in die alpinen Bereiche verbreitet /45/.

Die oberirdischen Teile der Pflanze wurden während der Blütezeit im August 1982 in Canazei/Italien gesammelt. Die luftgetrocknete Pflanze wurde dann in einer Drogenmühle pulverisiert und aufgearbeitet.

/45/ Flora Europaea Bd. 4
Cambridge University Press (1976/77)

2.2. Phytochemische Beschreibung

2.2.1 Extraktion

Zur Extraktion der Droge wird das von Röder und Wiedenfeld beschriebene Verfahren angewendet /46/.

Die getrocknete und pulverisierte Droge wird fünf Tage erschöpfend in einer Soxhletapparatur mit Methanol extrahiert und der Extrakt im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Der teerartige Rückstand wird in 2,5 %iger Salzsäure gelöst und zur Abtrennung von Chlorophyll und anderen apolaren Bestandteilen mit Ether und Dichlormethan ausgeschüttelt. Durch anschließende Ammoniakalisierung der wässrig - sauren Phase werden die Alkaloide in ihre freien Basen überführt, so daß sie nun mit Dichlormethan ausschüttelbar sind. Dieser Vorgang wird zur Reinigung des Alkaloidextraktes mehrfach wiederholt. Man erhält nach Abdampfen des organischen Lösungsmittel den sogenannten Alkaloid - Rohextrakt (RE).

Um eventuell vorhandene wasserlösliche Alkaloid-N-Oxide zu erfassen, wird parallel hierzu die salzsaure Phase mit Zinkstaub versetzt. Die zu freien Basen reduzierten N-Oxide können nun nach dem zuvor beschriebenen Schema gereinigt werden.

/46/ E. Röder, H. Wiedenfeld;
Phytochemistry 16, 1462 (1977)

2.2.2 Nachweis der Alkaloide

Der RE wird in Methanol gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Fließmittel dient ein Gemisch aus Dichlormethan/Methanol/Ammoniak konz. im Verhältnis 85:14:1. Die entwickelte DC - Platte wird mit Dragendorffs Reagens auf Anwesenheit stickstoffhaltiger Basen geprüft und mit dem für PA wesentlich empfindlicheren Reagens nach Dann und Mattocks /47, 48/ besprüht.

Diese Methode beruht auf Überführung der Pyrrolizidinalkaloide in ihre N-Oxide. Anschließend erfolgt die Umsetzung zum Pyrrolderivat und eine Farbreaktion dieser gebildeten Verbindungen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd zu einem rötlichen oder blau-violetten Farbstoff. Das Reaktionsschema ist in Abb. 2 wiedergegeben.

Eine Rotfärbung tritt bei PA mit gesättigtem Necingrundkörper und eine Violettfärbung bei Necinen mit ungesättigter Struktur auf.

Alkaloide vom Otonecintyp ergeben fast keine Färbung, da wegen der Quarternisierung des Stickstoffs keine N-Oxidbildung möglich ist und unter den Versuchsbedingungen eine Abspaltung der Methylgruppe nicht erfolgt.

/47/ A. T. Dann; Nature (London) 186, 1015 (1960)
/48/ A. R. Mattocks; J. Chromatogr. 27, 505 (1967)

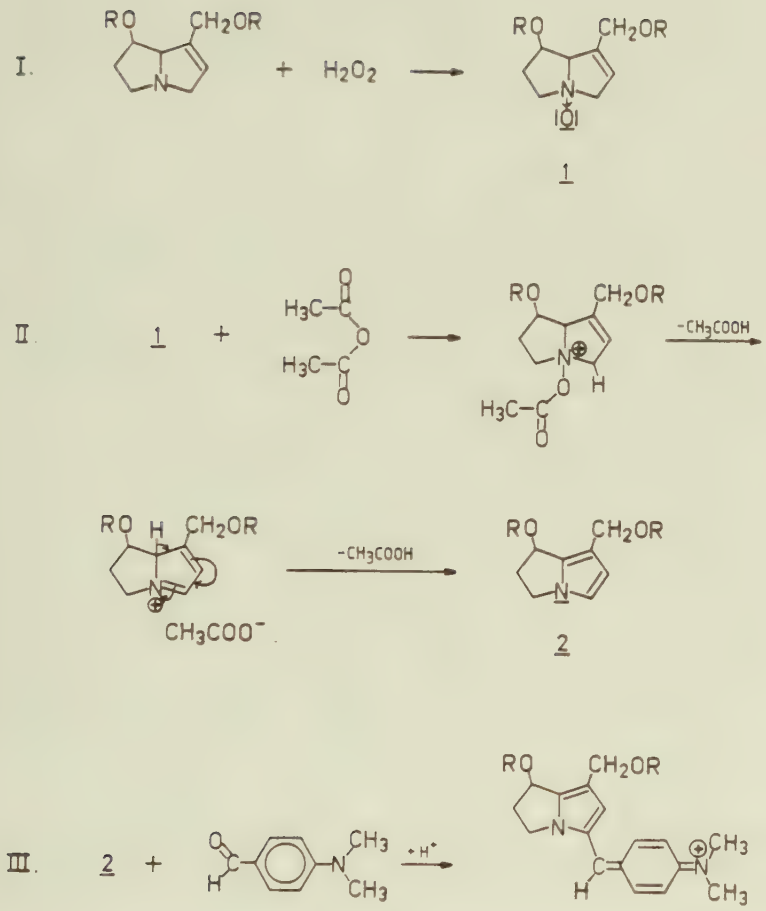


Abb. 2 Reaktionsschema der Probe nach Dann und Mattocks

Bei dem dünnschichtchromatographisch untersuchten RE wird sowohl mit Dragendorffs Reagens als auch mit der Dann-Mattocks'schen Probe eine anfärbbare Zone mit dem Rf - Wert von 0,53 sichtbar. Die blaue Färbung bei der Dann - Mattocks'schen Probe deutet auf einen ungesättigten Necingrundkörper hin.

2.2.3 Isolierung

Der wie unter Kap. 2.2.1 beschriebene aufgearbeitete Extrakt zeichnet sich durch hohe Reinheit aus. Dies äußert sich im Dünnschichtchromatogramm dadurch, daß neben der erwähnten Zone mit dem Rf - Wert von 0,53 keine weiteren Verunreinigungen zu erkennen sind. Das vorhandene Pyrrolizidinalkaloid läßt sich daher einfach mit Aceton aus dem RE direkt kristallisieren. Wie sich bei den anschließenden Untersuchungen herausstellte, handelt es sich hierbei um ein dünnschichtchromatographisch nicht auftrennbares zweikomponentiges Alkaloidgemisch.

Die Strukturen konnten durch IR-, Massen-, ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

2.3 Strukturaufklärung

2.3.1 Identifizierung des Alkaloidgemisches 1

Das aus Aceton umkristallisierte Alkaloid weist einen Schmelzpunkt von 240°C unter Zersetzung auf. Die in Chloroform bestimmte optische Drehung beträgt $[\alpha]_D^{20} = -41°$.

Das in Abb. 3 angegebene IR - Spektrum zeigt bei 3400 cm^{-1} eine Absorption für die OH-Valenzschwingung. Die Alkanbanden liegen bei 2980 - 2780 cm^{-1}. Bei 1740 cm^{-1} sieht man die Banden für einen gesättigten und bei 1720 cm^{-1} für einen α, β - ungesättigten Ester. Die Absorption bei 1660 cm^{-1} deutet auf eine unsymmetrisch substituierte Doppelbindung im Alkaloid hin.

Im Massenspektrum (Abb. 4) kann dem Molekülpeak M^+ von 335 die Summenformel $C_{18}H_{25}NO_5$ zugeordnet werden. Durch Umlagerung und CO_2 - Abspaltung beginnt der Zerfall der Säurekomponente. Dabei muß die Fragmentierung am C-9 erfolgen, da, bedingt durch die Doppelbindung in der 1,2 - Stellung, nur hier eine Aromatisierung erfolgen kann. Aus den charakteristischen Peaks bei m/e 291, 248 und 220 kann auf die angegebene Art der Veresterung geschlossen werden. Die Fragmente m/e 138, 137, 136 sowie 121, 120 (Basepeak), 119, 95, 94, 93 und 80 sind für Retronecin bzw. das diastereomere Heliotridin als Grundkörper typisch /49/. Das Zerfallsschema für die eine Komponente, Integerrimin, wird in Abb. 5 dargestellt. Auf die Wiedergabe des Zerfallsschema für das Isomere Senecionin wird hier verzichtet, da es dem des Integerrimin gleicht.

/49/ B. Hesse; Alkaloide, Fortschritt der Massenspektroskopie 3, 229 Verlag Chemie, Weinheim (1975)

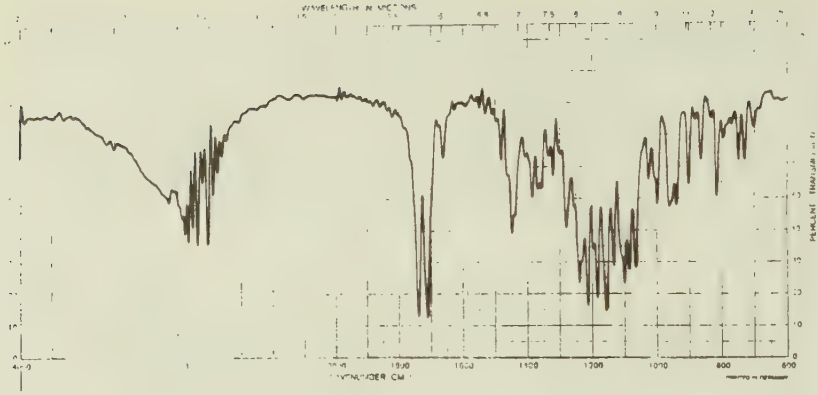


Abb. 3 IR-Spektrum des Alkaloidgemisches 1

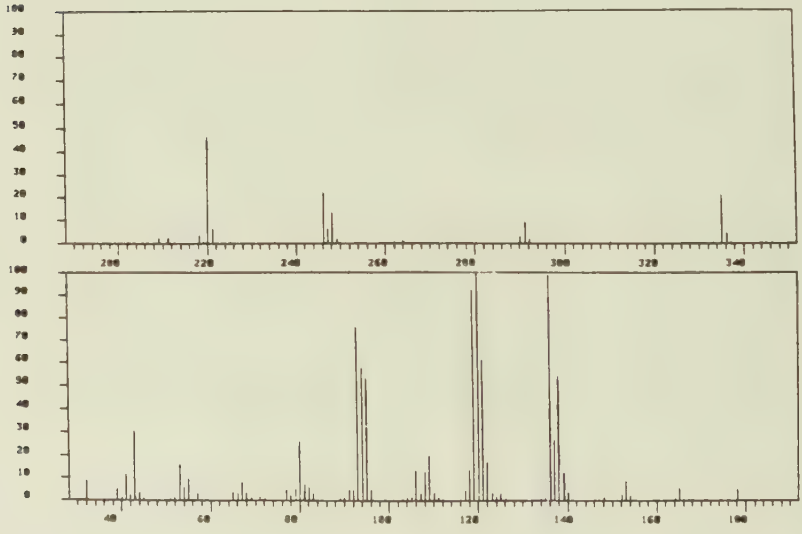


Abb. 4 Massenspektrum des Alkaloidgemisches 1

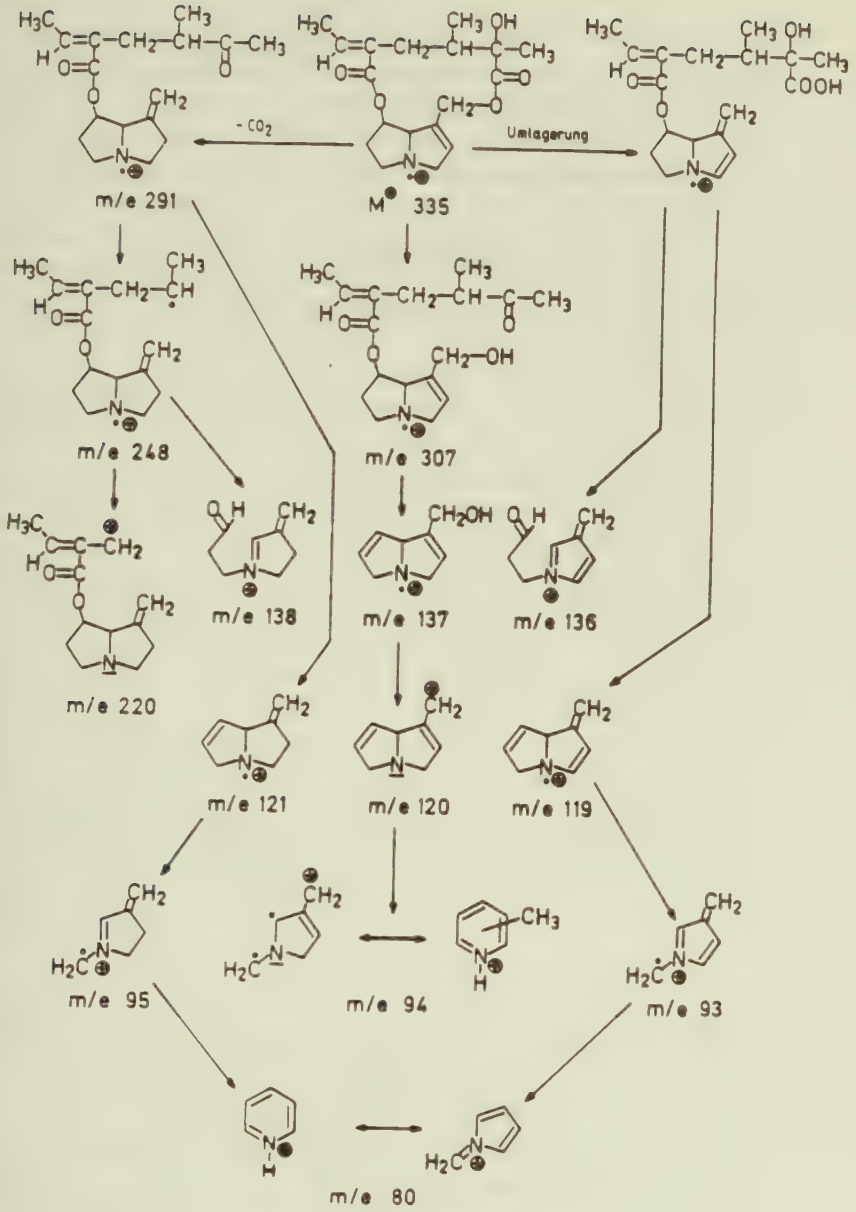


Abb. 5 Zerfallsschema des Alkaloidgemisches 1
gezeigt am Integerrimin

Abb. 6 zeigt das ^{1}H-NMR - Spektrum des Alkaloidgemisches. Da der bicyclische Necingrundkörper eine Ringspannung besitzt, sind die Protonen der drei Methylengruppen am C-3, C-5 und C-6 nicht magnetisch äquivalent, sondern werden als AB-System erkannt. Wegen der Nachbarschaft zum elektronegativen Stickstoff und zur Doppelbindung sind die Protonen des C-3 gegenüber denen des C-5 am weitesten zu tieferem Feld hin verschoben. Die Methylengruppe am C-6 erscheint als Multiplett bei 2, 12 ppm bzw. 2, 28 ppm. Dies weist auf Retronecin als Grundkörper hin, da die Protonen des diastereomeren Heliotridin ein Signal unter 2 ppm besitzen /50/. Wichtig ist das Quartett bei 5, 7 ppm für das Methinproton des C-18, womit die E-Ständigkeit zur Carboxylgruppe am C-15 angezeigt wird (Senecionin). Auf Grund dieser trans - Stellung ist die allylische Kopplung zu den Protonen am C-13 mit J=1, 5 Hz sichtbar. Darüber hinaus tritt bei 6, 5 ppm ein Quartett mit einer vicinalen Kopplung vom J=7 Hz auf. Hierbei muß es sich ebenfalls um ein olefinisches Proton handeln, das jedoch im Gegensatz zum vorher genannten eine Z-Stellung aufweist (Integerrimin) /51/.

Danach handelt es sich bei Alkaloidgemisch 1 um Senecionin und Integerrimin.

Auf Grund der Integration über die Signale der Methinprotonen am C-18 läßt sich errechnen, daß das Isomerenpaar Senecionin/Integerrimin bezüglich der Strukturfragmente C14 - C18 - C19 - H im Verhältnis 4:1, 2 vorliegt. Dieses Verhältnis läßt sich auch aus der optischen Drehung bestimmen.

/50/ C.C.J. Culvenor, M.L. Hefernan, W.G. Woods;
Aust. J. Chem. 18, 1605 (1965)

/51/ L.B. Bull, C.C.J. Culvenor, A.T. Watt;
The Pyrrolizidine Alkaloids, North Holland Publishing Company, Amsterdam S. 48 (1968)

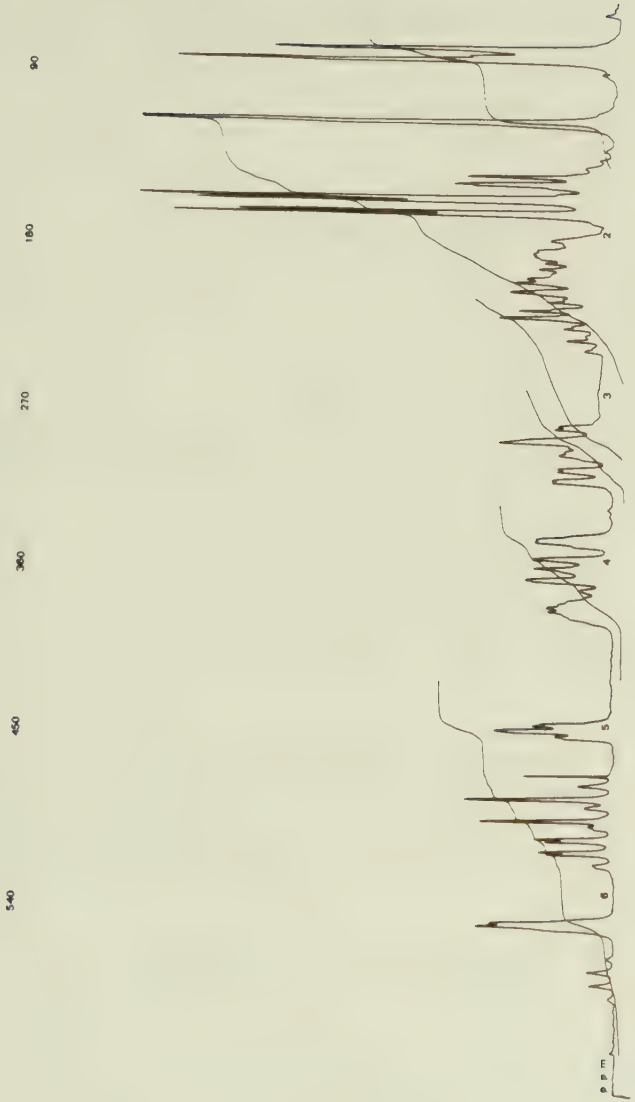


Abb. 6 ^{1}H-NMR Spektrum des Alkaloidgemisches 1

Unter der Voraussetzung, daß die spezifische Drehung konzentrationsunabhängig ist, kann das Verhältnis Senecionin / Integerrimin aus folgender Formel berechnet werden.

$$a \cdot [\alpha_1]_D^{20} + b \cdot [\alpha_2]_D^{20} = [\alpha_3]_D^{20}$$

a= prozentualer Anteil Senecionin im Gemisch

b= 1-a= prozentualer Anteil Integerrimin im Gemisch

$[\alpha_1]_D^{20}$= spezifische Drehung für Senecionin

$[\alpha_2]_D^{20}$=spezifische Drehung für Integerrimin

$[\alpha_3]_D^{20}$= spezifische Drehung des Gemisches

Die in Chloroform gemessene optische Drehung beträgt für das Gemisch $[\alpha]_D^{20}=-41^\circ$, für Senecionin $[\alpha]_D^{20}=-56^\circ$ und für Integerrimin $[\alpha]_D^{20}=+4,3^\circ$. Aus diesen Werten läßt sich das Verhältnis Senecionin / Integerrimin zu 75,1% / 24,9% bestimmen.

Die ^{1}H-NMR Daten sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1 ^{1}H-NMR Daten des Alkaloidgemisches 1

Protonen am Kohlenstoffatom	J			Senecionin in ppm	Integerrimin in ppm
C-18	7Hz;1,5Hz	q	1H	5,75	6,50
C- 2		m	1H	6,21	6,21
C- 9 Ha	130Hz;11,5Hz	dd	2H	5,50	5,40
Hb				4,00	4,05
C- 7		m	1H	5,06	5,00
C- 8		m	1H	4,25	4,25
C- 3 Ha	43Hz; 1,5Hz	dd	2H	3,90	3,90
Hb				3,25	3,25
C- 5 Ha	72Hz; 1,5Hz	m	2H	3,50	3,50
Hb				2,72	2,72
C-13 Ha		m	2H	2,55	2,55
Hb				2,46	2,46
C- 6 Ha		m	2H	2,12	2,12
Hb				2,28	2,28
C-19	7Hz, 1,5Hz	d	3H	1,85	1,85
C-12		m	1H	1,63	1,63
C-16		s	3H	1,33	1,30
C-17	6Hz	d	3H	0,92	0,92
C-11OH	D_2O-Austausch			3,18	3,18

Das Vorliegen eines Isomerengemisches wird auch durch eine Verdoppelung der Peaks und eine Verschiebung des entsprechenden C-13 im ^{13}C-NMR Spektrum (Abb. 7) bestätigt.

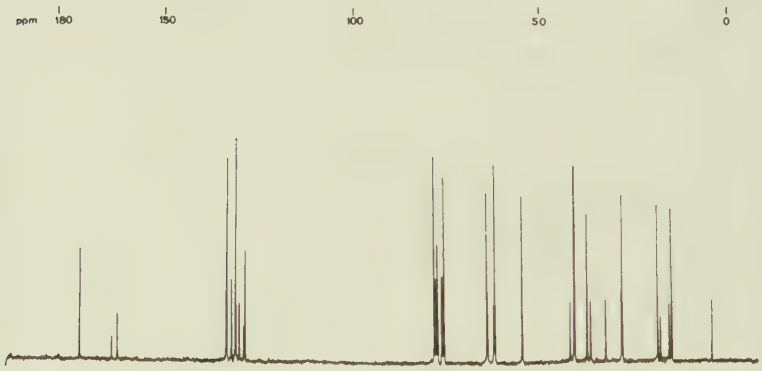


Abb. 7 ^{13}C-NMR Spektrum des Alkaloidgemisches 1

Eine Zuordnung der Peaks erfolgt durch die Interpretation von gekoppelten und entkoppelten Spektren. Die Nachbarschaft zum elektronegativen Stickstoff bewirkt auch hier die Verschiebung der Kohlenstoffe C-3 und C-5 zu tieferem Feld gegenüber C-6 hin. Dem Kohlenstoff am C-3 wird auf Grund seiner vicinalen Stellung zur Doppelbindung der Wert von 62,92 ppm (62,72 ppm für Integerrimin) und C-5 der Wert von 53,11 (53,18) ppm zugeordnet. C-6 zeigt ein Signal bei

34,8 (33,8) ppm. Im gekoppelten Spektrum erkennt man eine ^3J - Koppung von C-6 zum C-8-H_1 von 4 Hz, das nach der Karplusbeziehung auf einen Dieder-Winkel von 120° hinweist. Es handelt sich daher um Retronecin als Grundkörper, da im diastereomeren Heliotridin ein Winkel von 90° vorhanden ist und somit keine sichtbare ^3J - Kopplung bewirkt /52/. Als schwierig erweist sich die Zuordnung der Kohlenstoffe C-2 und C-18 sowie C-1 und C-14, zumal die Angaben in der Literatur widersprüchlich sind /53, 54/. C-2 geht eine zweifache allylische Kopplung sowohl zum C-8-H_1 als auch zum C-9-H_2 ein. Ihm wird der Wert von 136,6 (136,8) ppm und C-18 mit einer allylischen Kopplung zum C-13-H_2 der Wert von 134,2 (135,3) ppm zugeordnet. Die Nachbarschaft zur Carboxylgruppe bewirkt eine Tieffeldverschiebung des C-14 gegenüber dem C-1. Ihm wird daher der Wert von 133,1 (134,0) ppm zugewiesen. Hervorzuheben ist die unterschiedliche Verschiebung des C-13 beim Senecionin und seinem Isomeren Integerrimin. So erscheint beim Integerrimin ein Signal bei 29,6 ppm, beim Senecionin jedoch bei 38,4 ppm. Diese Hochfeldverschiebung beim Integerrimin kann nur durch die andere geometrische Winkelung erklärt werden, wie auch schon Drewes und Mitarbeiter bei Untersuchungen der freien Säure feststellten /55/.

Die Zuordnung der Peaks ist in der Tab. 2 aufgelistet.

/52/ E. Breitmaier, W. Voelter;
^{13}C-NMR - Spektroskopy, Verlag Chemie, Weinheim (1978)

/53/ R.J. Molyneux, J.N. Roitman, M. Benson, R.E. Lundin;
Phytochemistry 21, 439 (1982)

/54/ H. Casal, J. Altamirano, P. Moyna;
Gazz. Chim. Ital. 107, 361 (1977)

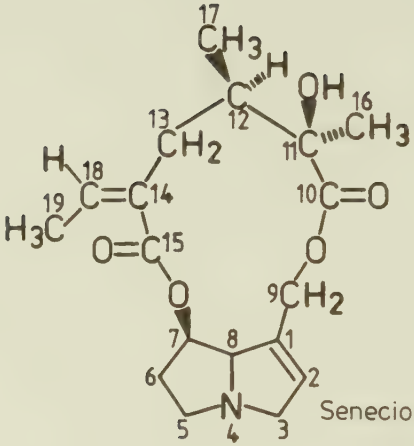
/55/ S.E. Drewes, J. Antonowitz, P.T. Kaye;
J.C.S. Perkin I, 287 (1981)

Tab. 2 ^{13}C-NMR Daten des Alkaloidgemisches 1

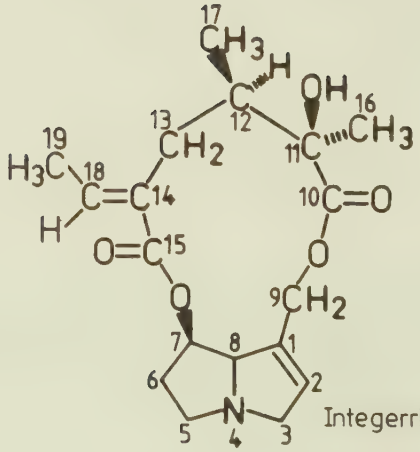
C - Atom	Senecionin	Integerrimin
C-17	11,1 ppm	11,8 ppm
C-19	15,0 ppm	14,2 ppm
C-16	24,9 ppm	25,2 ppm
C-13	38,4 ppm	29,6 ppm
C-6	34,8 ppm	33,8 ppm
C-12	38,2 ppm	39,5 ppm
C-5	53,11 ppm	53,18 ppm
C-9	60,6 ppm	60,9 ppm
C-3	62,9 ppm	62,7 ppm
C-7	74,9 ppm	75,5 ppm
C-11	76,7 ppm	76,6 ppm
C-8	77,7 ppm	77,2 ppm
C-1	131,5 ppm	131,8 ppm
C-14	133,1 ppm	134,0 ppm
C-18	134,2 ppm	135,3 ppm
C-2	136,6 ppm	136,8 ppm
C-15	167,6 ppm	169,2 ppm
C-10	178,2 ppm	178,3 ppm

Somit handelt es sich beim Alkaloidgemisch 1 um das Isomerenpaar Senecionin /56/ mit der relativen Konfiguration eines trans-6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-3, 6-dicarbonyl-retronecins und Integerrimin /57, 58/ mit der relativen Konfiguration eines cis-6-Hydroxy-5-methyl-2-hepten-3, 6-dicarbonyl-retronecins.

/56/ H. Wiedenfeld, E. Röder; Phytochemistry 18, 1083 (1979)
/57/ C. C. J. Culvenor, W. G. Woods; Aust. J. Chem. 18, 1625 (1965)
/58/ H. J. Jones, C. C. J. Culvenor, L. W. Smith;
Aust. J. Chem. 35, 1173 (1982)



Senecionin



Integerrimin

2.3.2 Isomerentrennung

2.3.2.1 GC - Analyse

Eine weitere Bestätigung für das Vorhandensein eines Isomerenpaares liefert die GC/MS-Analyse. Durch den Einsatz der Kapillar - GC läßt sich das Isomerenpaar auftrennen, so daß zwei Peaks mit den Rt-Werten 9,25 min und 9,80 min erhalten werden (s. experimentellen Teil). Eine GC/MS-Analyse bestätigt das Vorliegen von Senecionin und Integerrimin. Die beiden Massenzerfallsreihen sind in ihrer Fragmentierung identisch und unterscheiden sich nur bezüglich der Intensität der Fragmentenpeaks. Die GC/MS-Analyse ist in Abb. 8a und b wiedergegeben.

2.3.2.2 Säulenchromatographie

Zur präparativen Trennung wird eine Säulenchromatographie mit dem Alkaloidgemisch 1 durchgeführt. Das Gemisch wird auf einer ca. 2,3o m langen mit Kieselgel 60 gefüllten Säule (Durchmesser ca. 1 cm) aufgetragen. Als Fließmittel dient Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 92:8. Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen und durch Kapillar - GC untersucht. Die erfolgreiche Trennung des Isomerengemisches zeigt Abb. 9 und 11 (^{1}H-NMR) für Probe 1 und Abb. 10 und 12 (^{1}H-NMR) für Probe 2. In den ^{1}H-NMR Spektren der beiden Proben erkennt man deutlich die unterschiedliche Verschiebung des Methinprotons C-18. Für Integerrimin wird ein Wert von 6,5 ppm, da es Z-ständig zur Carboxylgruppe steht und für Senecionin auf Grund seiner E-Ständigkeit zu C-15 ein solcher von 5,7 ppm erhalten (s. Kap. 2.3.1).

Senecionin wird daher der Rt-Wert von 9,25 min und dem Integerrimin der von 9,8 min zugeordnet.

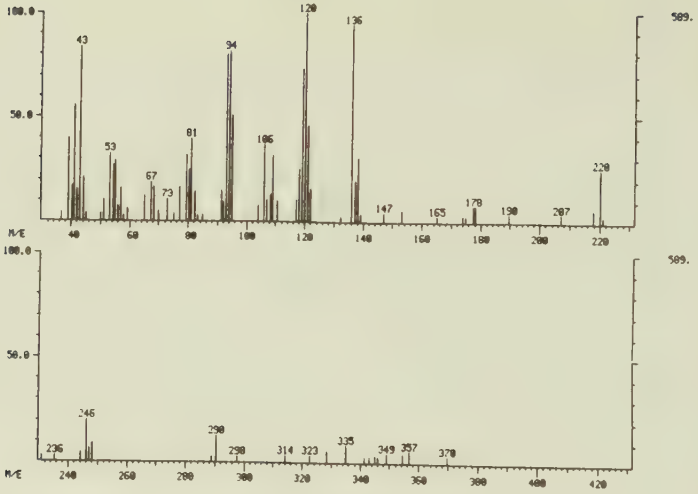


Abb. 8a Massenspektrum der GC/MS-Analyse Rt-Wert 9,25 min
- Senecionin -

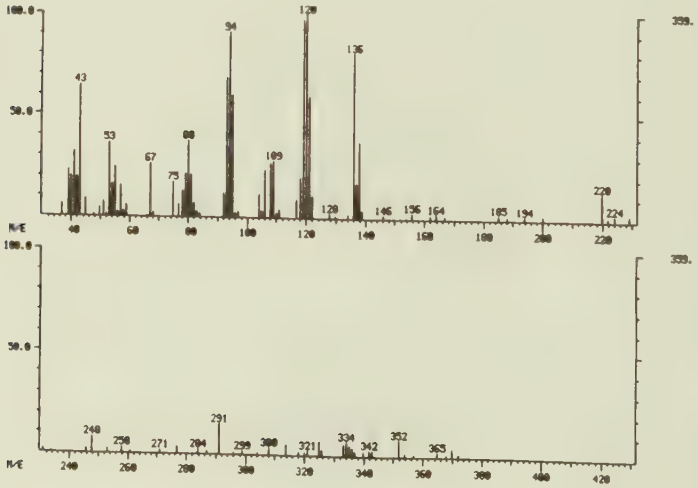


Abb. 8b Massenspektrum der GC/MS-Analyse Rt-Wert 9,80 min
- Integerrimin -

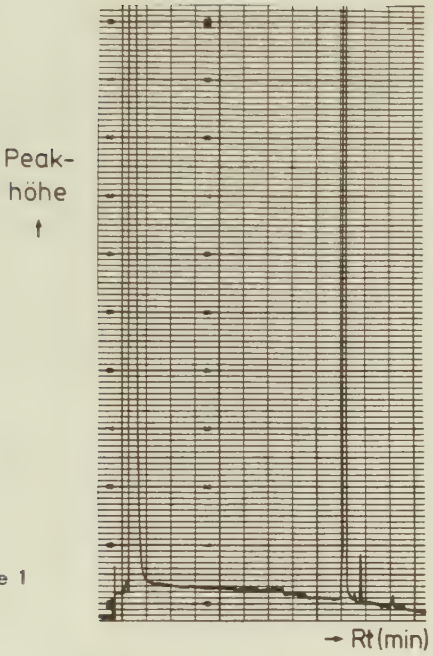


Abb. 9 GC-Analyse der Probe 1
- Senecionin -

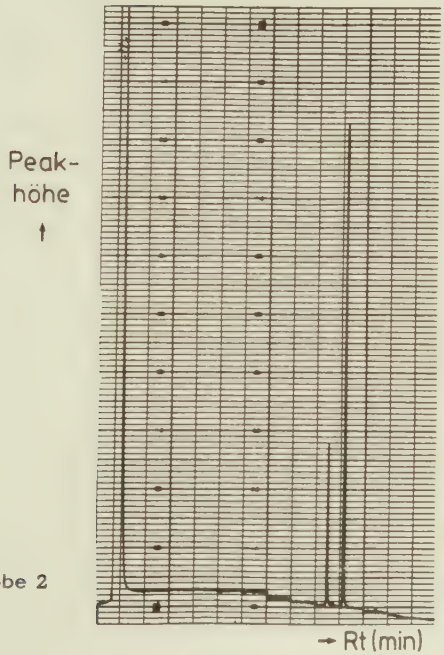


Abb. 10 GC-Analyse der Probe 2
- Integerrimin -

Abb. 11 ^{1}H-NMR Spektrum der Probe 1
- Senecionin -

Abb. 12 ^{1}H-NMR Spektrum der Probe 2
- Integerrimin -

2.4 Synthese eines Metaboliten von Alkaloid 1

Schon früh erkannte man, daß der Verzehr von pyrrolizidinhaltigen Pflanzen zu Leberzhirrhosen und Lungenschäden führte. Hierfür konnten die Pyrrolizidinalkaloide bzw. ihre Metabolite verantwortlich gemacht werden.

Um diese Metabolisierung nachzuvollziehen, wird die Synthese eines Pyrrolderivates aus dem Pyrrolizidinalkaloid Senecionin angestrebt. Dabei soll analog der in vivo Reaktion die Synthese über die N-Oxid Stufe ablaufen. Hierzu werden verschiedene Oxidationsmittel verwendet, um möglichst quantitativ das Alkaloid umzusetzen und anschließend direkt nach Dehydratisierung das gewünschte Pyrrol zu erhalten. Die Reaktion soll aus Gründen der Löslichkeit in Dichlormethan ablaufen.

Der Nachweis der Pyrrole bzw. deren Derivate kann durch eine Farbreaktion mit Ehrlichs Reagenz durchgeführt werden.

2.4.1 Oxidationsmittel Monoperphthalsäure

Monoperphthalsäure bietet sich als Oxidationsmittel /59/ an, da die bei der Reaktion anfallende Phthalsäure unlöslich in Dichlormethan ist und somit aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt werden könnte.

Trotz Abänderung der Reaktionsbedingungen führt die Umsetzung vom Senecionin mit einem Überschuß an Monoperphthalsäure nicht zum Erfolg, da offensichtlich die Oxidationsstärke der Monoperphtalsäure in Methylenchlorid nicht ausreicht.

/59/ M.A. Stahmann, M. Bergmann; J. Org. Chem. 11, 586 (1946)

2.4.2 Oxidationsmittel m - Chlorperbenzoesäure

Als stärkeres Oxidationsmittel wird m-Chlorperbenzoesäure gewählt /60/. Diese Persäure reagiert unter Eiskühlung mit Senecionin zum Senecionin - N-Oxid, was mittels DC-Analyse nachgewiesen wird. Da eine direkte Dehydratisierung nicht zum Erfolg führt, wird der Umweg über Acetylierung und Abspaltung von Acetat analog der Dann'schen Probe gewählt. Nach Zerstörung der überschüssigen Persäure mit Mangandioxyd wird das Filtrat unter Stickstoff mit dem Acetylierungsgemisch Acetanhydrid/Pyridin bei Raumtemperatur umgesetzt. Zur Abtennung des überschüssigen Acetylierungsgemisches und Entfernung der Essigsäure wird das Reaktionsgemisch mit Eiswasser versetzt. In diesem wässrig - sauren Milieu findet eine Esterspaltung statt. Die organische Phase wird durch Niederdrucksäulenchromatographie gereinigt. Fließmittel sind zunächst Dichlormethan und ein Gemisch aus Dichlormethan/Methanol. Es kann eine weiße Substanz mit einem Rf - Wert von 0,82 erhalten werden. Mit Ehrlichs Reagenz reagiert diese Substanz durch Rotfärbung, nach dem Erhitzen durch Blaufärbung. Dies weist auf ein Pyrrol hin. Von dieser Substanz wurde ein ^{1}H-NMR Spektrum angefertigt (Abb. 13).

/60/ J. Cymerman Craig, K.K. Purushothaman
J. Org. Chem. 35, 1721 (1970)

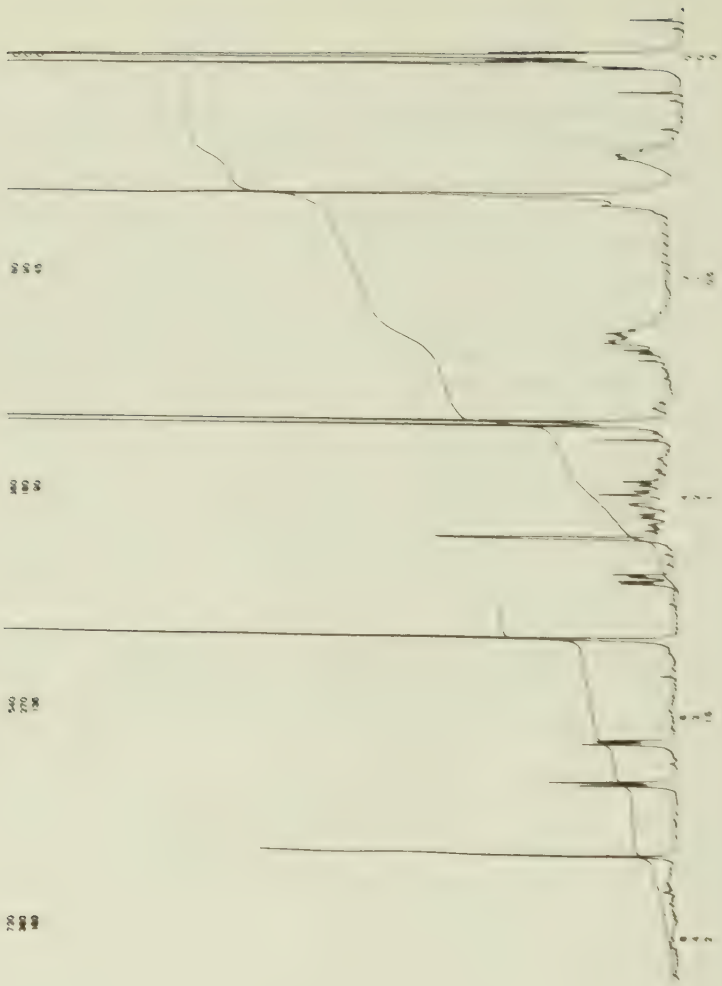


Abb. 13 ^{1}H-NMR Spektrum von Dehydroretronecin

Die stark ins Tieffeld verschobenen Methinprotonen am C-2 und C-3 sind typisch für den Pyrrolgrundkörper. Die Nachbarschaft zum elektronegativen Stickstoff bedingt die Zuordnung des Wertes von 6,65 ppm zum Methinproton am C-3, während dem am C-2 ein Wert von 6,3 ppm zukommt. Beide Signale weisen eine ^{3}J - Kopplung von J=3 Hz auf. Die Methylenprotonen des C-5 mit einer chemischen Verschiebung von 3,95 ppm sind wegen der direkten Nachbarschaft zum Pyrrolsystem stärker ins Tieffeld verschoben als die des Retronecins mit einem Wert von 2,7 ppm bzw. 3,2 ppm (AB-System) /50/. Das Multiplett bei 2,55 ppm kann den Methylenprotonen am C-6 zugeordnet werden. Das Methinproton am C-7 bildet ein AB - System mit den Protonen des C-6H_2 mit einer Kopplungskonstante von 6 Hz. Die Protonen am C-9 spalten auf Grund einer ^{4}J-Fernkopplung zu einem Dublett mit einer Kopplungskonstante von 1 Hz auf.

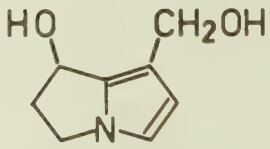
Die ^{1}H-NMR Daten sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3 ^{1}H-NMR Daten des Pyrrols

Protonen am Kohlenstoffatom	ppm		J
C-3	6,62	d 1H	3Hz
C-2	6,24	d 1H	3Hz
C-5	3,95	2H	
C-6	2,55	2H	
C-7	4,75	dd 1H	6Hz, 2Hz
C-9	4,38	d 2H	1Hz
C-9-OH	2,49	D_2O-Austausch	
C-7-OH	2,49	D_2O-Austausch	

Die gute Löslichkeit in protonischen Lösungsmitteln sowie die in dem ^{1}H-NMR Spektrum fehlenden Protonen der Säurekomponente deuten darauf hin, daß neben einer Pyrrolbildung auch eine Esterspaltung stattgefunden hat. Danach kann die isolierte Substanz als Dehydroretronecin /61/ identifiziert werden.

Trotz Arbeiten mit Schutzgas während der Reaktion werden unlösliche rote und schwarze Polymerisate gebildet.



Dehydroretronecin

/61/ C.C.J. Culvenor, J.A. Edgar, L.W. Smith, H.J. Tweeddale Aust. J. Chem. 23, 1853 (1970)

3.0 Senecio paludosus, ssp tomentosus L.

3.1 Botanische Beschreibung und Fundort

Senecio paludosus, ssp tomentosus, Sumpf - Kreuzkraut, ist eine ausdauernde 0,50 - 2 m hohe Pflanze mit einem aufrechten, hohlen, furchig gestreiften Stengel, der zur Blütezeit am unteren Teil ohne Laubblätter und am oberen Teil sehr dicht mit Laubblättern bestückt ist. Die Laubblätter sind lang zugespitzt, sehr stark sägezähnig, an der Oberseite kahl und an der Unterseite sehr stark weißfilzig behaart. Die Behaarung ist typisch für diese Unterart. Die 3 - 4 cm breiten Blütenköpfchen bilden einen endständigen einfachen Ebenstrauß. Die dreizehn Hüllblätter sind kahl und nur am Grund wollig. Die goldgelben Blüten haben dreizehn ca. 2 mm breite Zungenblüten. Die Früchte sind 3 mm lang und kahl. Der Pappus wird zur Blütezeit so lang wie die Kronröhre und ist zur Fruchtzeit dreimal so lang wie die Frucht.

Diese Pflanze wächst hauptsächlich an Flüssen, Bächen, Gräben, Seen und Teichen, d.h. bei stehenden oder langsam fließenden Gewässern.

Sie ist in Europa sehr weit verbreitet, von England bis Südfrankreich, in Spanien, Norditalien und im Balkan /45/.

Die oberirdischen Teile wurden im Tartlauer Moor/Rumänien während der Blütezeit im August 1983 gesammelt und die luftgetrocknete Droge in der Drogenmühle pulverisiert.

3.2 Phytochemische Beschreibung

3.2.1 Extraktion

Die getrocknete und gepulverte Droge wird in der Soxhlet-apparatur zwei Tage mit Petrolether und anschließend fünf Tage mit Methanol erschöpfend extrahiert. Nach Eindampfen der Lösungsmittel erfolgt die getrennte Aufarbeitung des Petrolether- bzw. des Methanolextraktes nach dem unter Kap. 2.2.1 angegebenen Verfahren.

3.2.2 Nachweis der Alkaloide

Nach dünnschichtchromatographischen Untersuchungen können in dem mit Petrolether extrahierten RE keine Alkaloide nachgewiesen werden. Die Extraktion mit Petrolether führt zur Abtrennung von Fetten, Gerbstoffen u. ä. Substanzen.

Abbildung 14 zeigt das DC - Chromatogramm des mit Methanol extrahierten und dann aufgearbeiteten RE. Mit der Dann - Mattocks'schen Methode sind zwei blaue Zonen mit den Rf - Werten von 0,53 und 0,31 sichtbar. Die Farbe deutet auf eine ungesättigte Necinbase hin.

3.2.3 Auftrennung und Isolierung

Zur Auftrennung des Alkaloidgemisches wird die Droplet Counter Current Chromatographie (DCCC) gewählt. Dieses Verfahren ist eine flüssig - flüssig - Trennung und beruht auf einer Verteilungschromatographie nach dem Nernst'schen Verteilungssatz.

Es werden zwei nicht miteinander mischbare Phasen benötigt, wobei die eine als stationäre Phase dient. Mit dieser werden die über Teflonkapillaren hintereinander verbundenen Glassäulen gefüllt, durch die die zweite, mobile Phase entweder in aufsteigender oder absteigender Methode geführt wird. Die Selektivität des Systems hängt von einer gleichmäßigen Durchmischung der stationären Phase mit der mobilen ab. Dies kann

erreicht werden, indem die mobile Phase in möglichst kleinen und gleichmäßig geformten Tröpfchen durch die stationäre Phase gepumpt wird /62/.

Die Probe wird sowohl bei der absteigenden als auch bei der aufsteigenden Methode in der stationären Phase gelöst. Die einzelnen Substanzen der Probe werden auf Grund des Verteilungskoeffizienten in verschiedenen Konzentrationen zwischen mobiler und stationärer Phase verteilt und unterschiedlich schnell transportiert /63/. Am Ende des Trennverfahrens werden die Tropfen von einem Fraktionssammler aufgefangen. Eine schematische Darstellung des DCC - Chromatographen zeigt Abb. 15.

Als Fließmittel wird eine Mischung von Chloroform, Toluol, Methanol und Wasser im Verhältnis 5:5:7:2 gewählt.

Nach Abschluß der DCCC-Trennung werden die gesammelten Fraktionen dünnschichtchromatographisch untersucht. Das Alkaloid mit dem Rf-Wert von 0,31 läßt sich nur in Spuren isolieren und keiner Strukturaufklärung zuführen. Das Alkaloid mit dem Rf - Wert von 0,53 kann mit Aceton als Lösungsmittel kristallin erhalten werden. Wie sich bei den anschließenden Untersuchungen herausstellte, handelt es sich um ein dünnschichtchromatographisch nicht auftrennbares Alkaloidgemisch.

/62/ K. Hostettmann; Chemie f. Labor u. Betrieb 32, 211 (1981)
/63/ Büchi Laboratoriums Technik GmbH
DCCC - Information 1, 14 (1983)

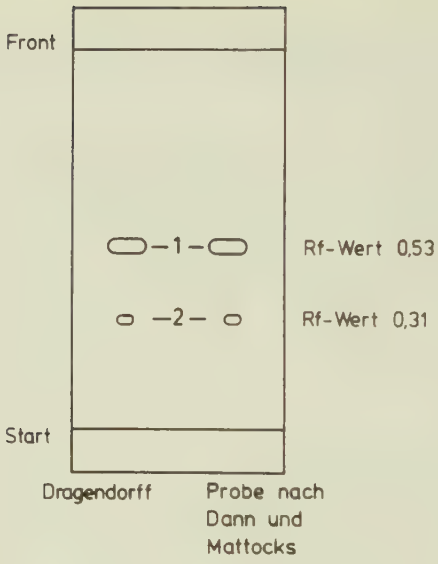


Abb. 14 DC-Diagramm von Senecio paludosus, ssp tomentosus

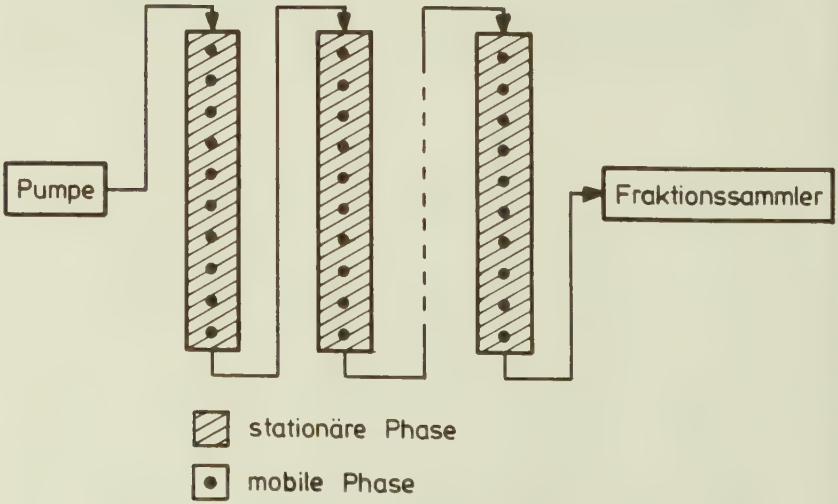


Abb. 15 Schematische Darstellung des DCCC
- absteigende Methode -

3.3 Strukturaufklärung des Alkaloidgemisches 2

Das aus Aceton umkristallisierte Alkaloid weist einen Schmelzpunkt von 220°C unter Zersetzung auf. Die in Ethanol gemessene optische Drehung beträgt $[\alpha]_D^{20} = -86°$.

Zur Strukturaufklärung wurden IR-, Massen-, ^1H- und ^{13}C-NMR Spektren angefertigt.

Das IR - Spektrum ist in Abb. 16 wiedergegeben. Bei 3400 cm^{-1} treten die Banden für eine OH-Valenzschwingung auf. Die Absorptionsbanden bei 1740 cm^{-1} deuten auf einen gesättigten und bei 1720 cm^{-1} auf einen α, β - ungesättigten Ester hin. Bei 1652 cm^{-1} liegt die Bande für eine unsymmetrisch substituierte Doppelbindung. Der aliphatische Charakter des Alkaloids wird durch die Alkanbanden von 2940 cm^{-1} - 2760 cm^{-1} deutlich.

Das in Abb. 17 wiedergegebene Massenspektrum weist einen Molekülpeak M^+ von 335 auf, dem die Summenformel $C_{18}H_{25}NO_5$ zugeordnet werden kann. Daneben erkennt man einen weiteren M^+ Peak von 333 mit der Summenformel $C_{18}H_{23}NO_5$. Aus der Intensität dieses Peaks muß geschlossen werden, daß es sich nicht um den M-2-Peak handelt, sondern daß eine zweite Substanz mit der angegebenen Masse vorliegt. Die Fragmente m/e 138, 137, 121, 120 (Basepeak), 119, 95, 94, 93 und 80 sind charakteristisch für Retronecin bzw. sein diastereomeres Heliotridin /49/. Da diese Zerfallsreihe nur einmal auftritt, muß die genannte zweite Verbindung den gleichen Grundkörper wie die Hauptkomponente aufweisen.

Der Zerfall der Säurekomponente beginnt mit einer CO_2 - Abspaltung, so daß bei m/e 291 und 289 jeweils ein Fragment mit der Summenformel $C_{17}H_{25}NO_3$ bzw. $C_{17}H_{23}NO_3$ auftritt. Durch sukzessiven Zerfall entstehen die Fragmente m/e 248 bzw. 246 mit der Summenformel $C_{15}H_{22}NO_2$ und $C_{15}H_{20}NO_2$. Nach weiterer Abspaltung

einer C_2H_4- bzw. C_2H_2 - Gruppe erhält man für beide Substanzen ein Fragment mit dem Peak bei m/e 220 und der Summenformel $C_{13}H_{18}NO_2$. Somit kann der Unterschied zwischen beiden Substanzen nur an der Verknüpfung am C-12 liegen. Die Substanz der Masse 335 muß an diesem Kohlenstoff eine Methylgruppe tragen, die zur Abspaltung des C-12 -, C-17 - Fragmentes in Form einer Ethylengruppe führt. Bei der zweiten Verbindung tritt eine Ethinspaltung auf, womit das Vorliegen der Ethylenstruktur C-12 - C-17 klar wird.

Danach könnte es sich bei den beiden Substanzen um Senecionin (M^+ 335) und Seneciphyllin (M^+ 333) handeln.

Das Zerfallsschema der beiden Substanzen gibt Abb. 18 und 19 wieder.

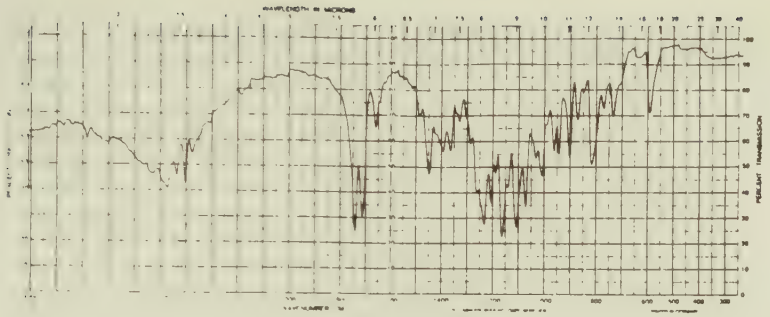


Abb. 16 IR-Spektrum des Alkaloidgemisches 2

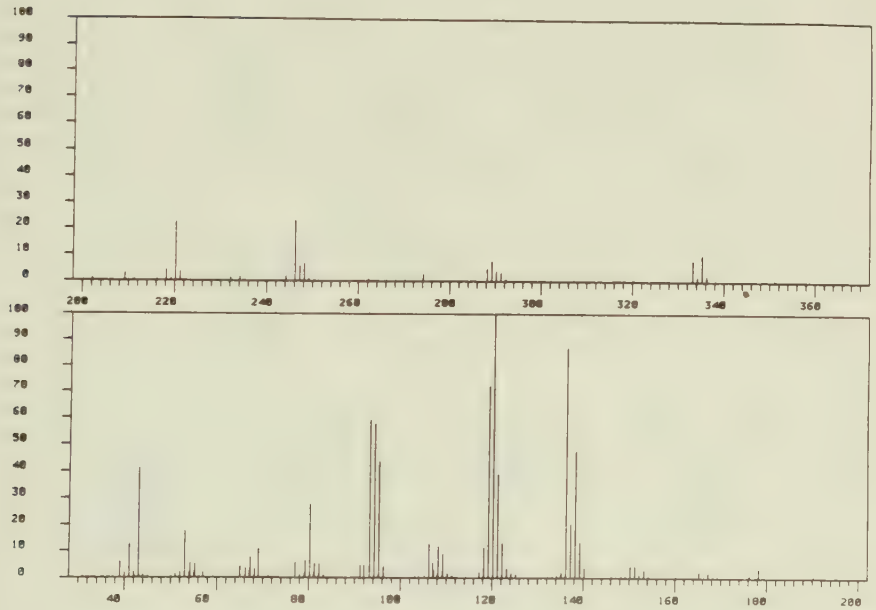


Abb. 17 Massenspektrum des Alkaloidgemisches 2

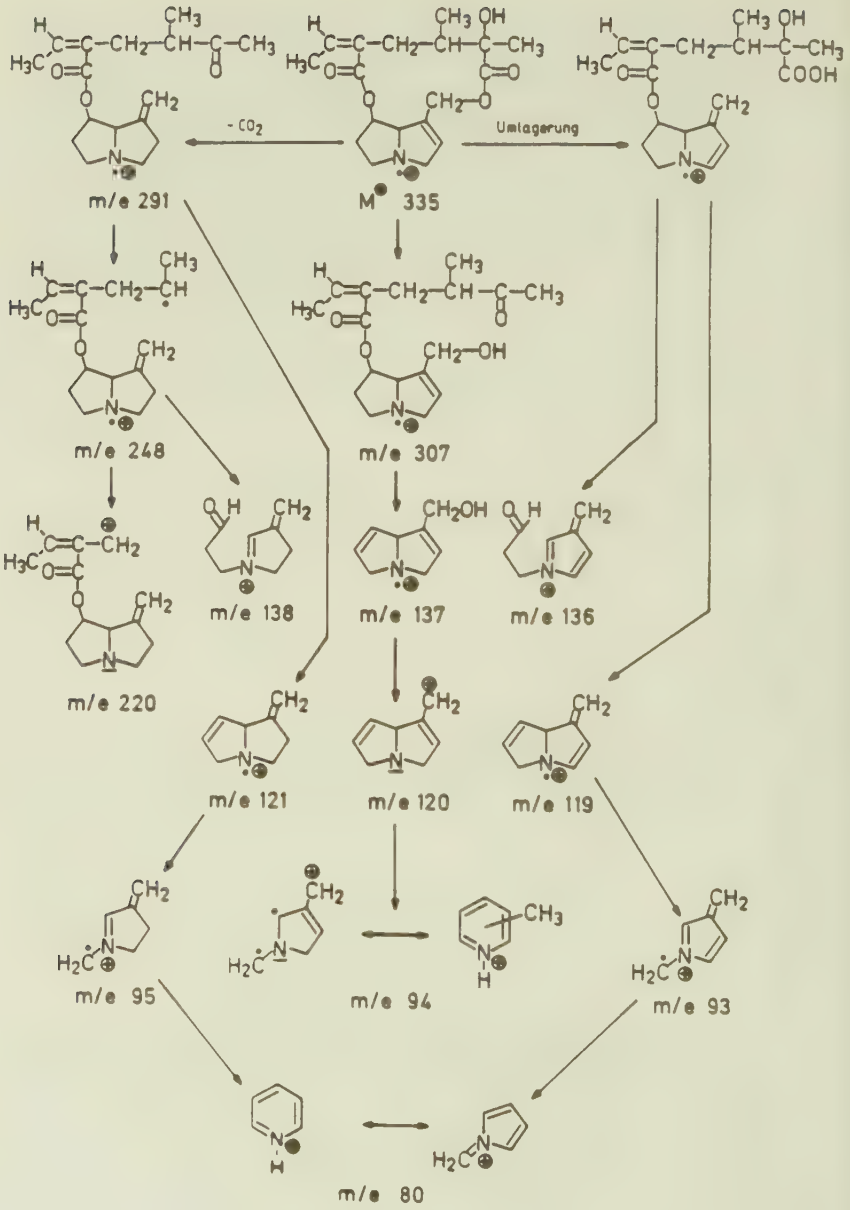


Abb. 18 Zerfallsschema des Senecionins

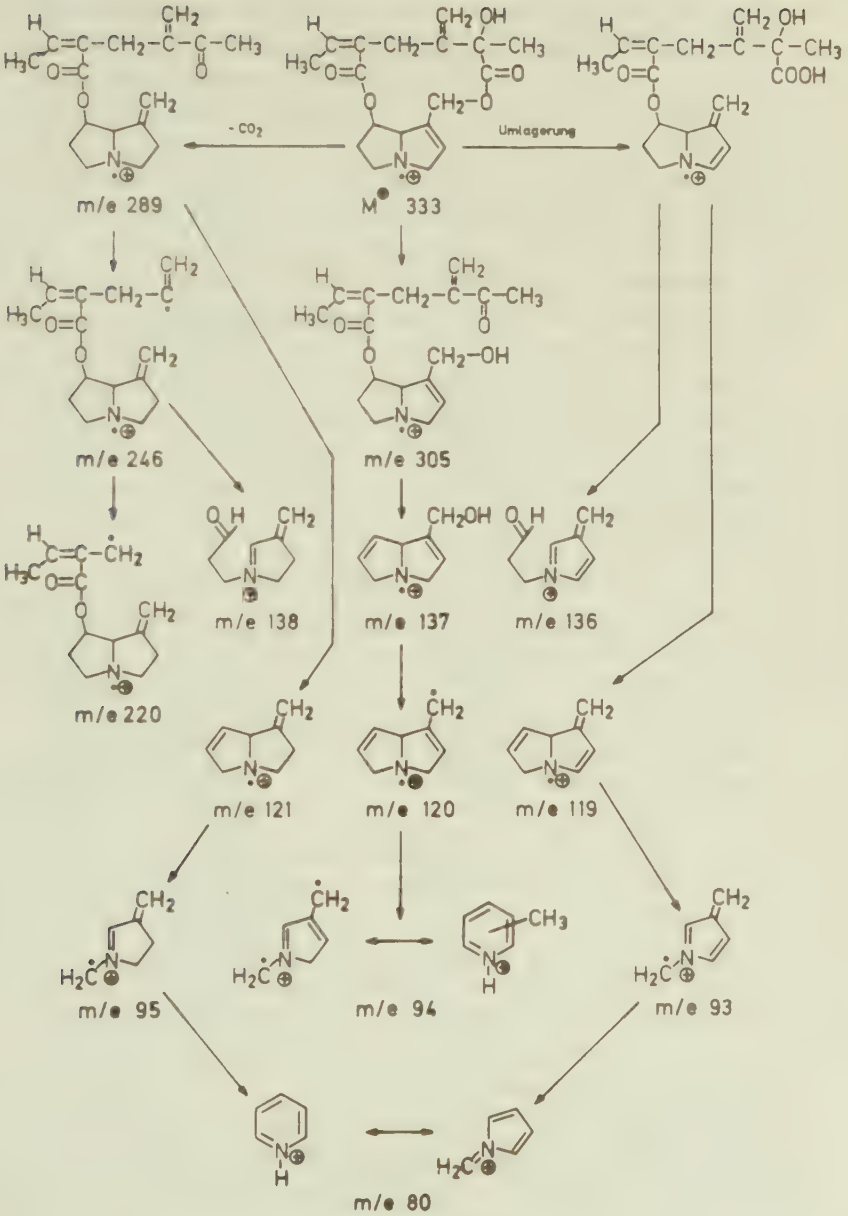


Abb. 19 Zerfallsschema des Seneciphyllins

Das ^1H -NMR Spektrum ist im Abb. 20 wiedergegeben. Der bicyclische Necingrundkörper bewirkt die magnetische Inäquivalenz der Methylenprotonen am C-3 und C-5, die ein AB-System bilden. Die Methylenprotonen am C-3 sind wegen der Nachbarschaft zur Doppelbindung und zum Stickstoff hierbei ins Tieffeld verschoben. Dabei kommt dem C-3Ha ein Wert von 3,9 ppm, C-3Hb ein Wert von 3,25 ppm zu, während C-5Ha ein Signal bei 3,5 ppm und C-5Hb bei 2,87 ppm hervorruft. Den Methylenprotonen am C-6 kann der Hochfeldwert von 2,12 ppm bzw. 2,28 ppm (AB-System) zugeordnet werden, das auf Retronecin als Grundkörper hinweist. Beim diastereomeren Heliotridin geben sie ein Signal bei 1,9 ppm. Die Methylenprotonen am C-9 bilden ein dublettisiertes AB-System mit einem Shiftunterschied von 130 Hz, das auf einen ringgeschlossenen Diester mit einer Ringgröße von 12 Gliedern hindeutet. Diese treten bei 5,67 ppm und 4,1 ppm für Senecionin sowie bei 5,49 ppm und 4,09 ppm im Falle des Seneciphyllins auf.

Der Unterschied zwischen Senecion und Seneciphyllin liegt in der Methyl- bzw. Methylengruppe am C-17. Die Methylgruppe am C-17 ergibt beim Senecionin ein Dublett bei 0,92 ppm mit einer Kopplungskonstanten von 6 Hz. Die Protonen am C-17 beim Seneciphyllin sind, bedingt durch ihren olefinischen Charakter, ins Tieffeld verschoben mit einem Wert von 5,25 ppm und einer geminalen Kopplung von J=25 Hz sowie einer allylischen Kopplung zum C-13H_2 von J=2 Hz.

Bei beiden Verbindungen weisen die Methylprotonen am C-19 bei 1,9 ppm eine vicinale Kopplung von 7 Hz und eine homoallylische Kopplung von 2 Hz auf. Das olefinische Proton des jeweiligen C-18 tritt als Quartett bei ca. 5,8 ppm mit einer vicinalen Kopplung von 7 Hz auf. Diese Verschiebung spricht für eine trans - Stellung des Methinprotons zur Carboxylgruppe C-15. Bei Z - Konfiguration wäre eine Tieffeldverschiebung zwischen 6,5 - 7,1 ppm zu erwarten.

Das Singulett der Methylprotonen am C-16 ist bei Seneciphyllin gegenüber dem des Senecionins wegen der Doppelbindung zwischen C-12 und C-17 ins Tieffeld verschoben und ergibt ein

Signal bei 1,55 ppm. Senecionin weist bei 1,33 ppm ein Signal für die Methylprotonen auf.

Die Werte sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4 ^{1}H-NMR Daten des Alkaloidgemisches

C-Atom	Seneconin		Seneciphyllin	Anzahl H
C-2	6,21 ppm		6,21 ppm	1H
C-18	5,75 ppm		5,87 ppm	1H
C-9Ha	5,67 ppm		5,49 ppm	1H
C-9Hb	4,10 ppm		4,05 ppm	1H
C-17			5,25 ppm	2H
			4,99 ppm	J=25Hz, 2Hz
C-7	5,06 ppm		5,06 ppm	1H
C-8	4,25 ppm		4,25 ppm	1H
C-3Ha	3,90 ppm		3,90 ppm	1H
C-3Hb	3,25 ppm		3,25 ppm	1H
C-5Ha	3,50 ppm		3,50 ppm	1H
C-5Hb	2,87 ppm		2,87 ppm	1H
C-13Ha	2,66 ppm		2,68 ppm	1H
C-13Hb	2,50 ppm		2,49 ppm	1H
C-6Ha	2,12 ppm		2,16 ppm	1H
C-6Hb	2,28 ppm		2,30 ppm	1H
C-19	1,95 ppm		1,90 ppm	3H
C-16	1,33 ppm		1,55 ppm	3H
C-12	1,67 ppm			1H
C-17	0,92 ppm	J=6Hz		3H
C-11-OH	3,18 ppm		3,58 ppm	D_2O-Austausch

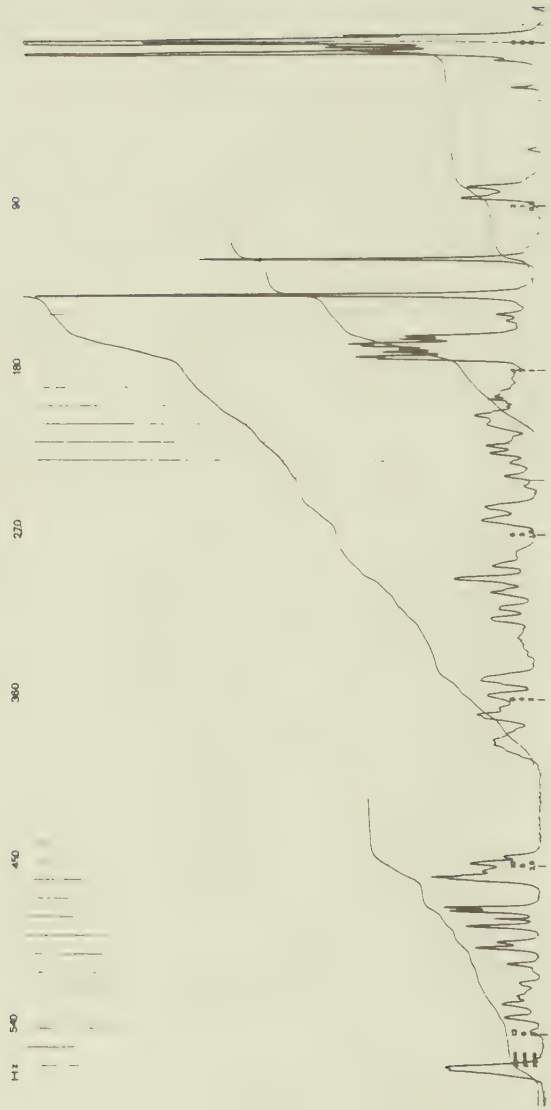


Abb. 20 ^{1}H-NMR Spektrum des Alkaloidgemisches 2

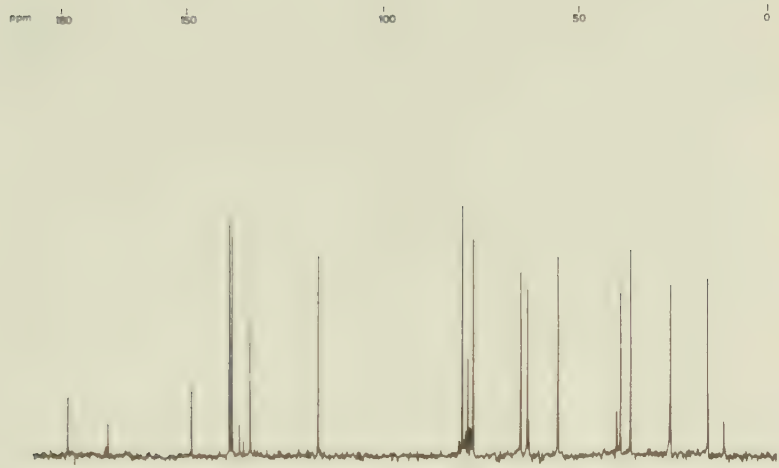


Abb. 21 ^{13}C-NMR Spektrum des Alkaloidgemisches 2

Das ^{13}C-NMR Spektrum gibt Abb. 21 wieder. Die Zuordnung der Peaks erfolgt durch die Interpretation von gekoppelten und entkoppelten Spektren. Auch hier weist die Verdoppelung der Kohlenstoffpeaks auf das Vorhandensein zweier Substanzen hin.

Die unterschiedliche Verschiebung der Kohlenstoffatome C-12 und C-17 identifizieren die beiden Substanzen. Beim Senecionin ist der Methinkohlenstoff am C-12 mit einer Methylgruppe verknüpft. Dieser Methylkohlenstoff gibt ein Signal bei 11,93 ppm. C-12 kommt der Wert von 39,1 ppm zu.

Beim Seneciphyllin ist der Kohlenstoff am C-12 über eine Doppelbindung mit dem Methylenkohlenstoffatom C-17 verknüpft. Dies bewirkt für beide Kohlenstoffatome eine Tieffeldverschiebung. C-17 zeigt bei 115,2 ppm ein Signal mit einer für sp^2-Hybridisierung charakteristischen ^1J-Kopplung von 151 Hz /64/. Für den Kohlenstoff C-12 wird der Tieffeldwert von 147,09 ppm gefunden.

Die Zuordnung aller Kohlenstoffatome ist in Tab. 5 aufgelistet.

/64/ M. Hesse, M. Meier, B. Zeeh;
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1979

Tab. 5 ^{13}C-NMR Daten des Alkaloidgemisches 2

Kohlenstoffatom	Senecionin in ppm	Seneciphyllin in ppm
C-19	15, 98	15, 98
C-16	25, 8	25, 8
C- 6	35, 7	35, 7
C-13	39, 26	39, 2
C- 5	53, 95	54, 11
C- 9	61, 63	62, 01
C- 3	63, 79	63, 66
C- 7	75, 8	75, 7
C-11	76, 52	77, 1
C- 8	78, 5	78, 5
C-17	11, 93	115, 2
C- 1	132, 31	132, 4
C-14	134, 04	135, 07
C-18	136, 8	136, 8
C- 2	137, 4	137, 4
C-12	39, 26	147, 09
C-15	167, 9	167, 9
C-10	177, 8	177, 8

Es handelt sich auf Grund der spektroskopischen Daten bei dem Alkaloidgemisch 2 um ein Gemisch der in der Literatur schon beschriebenen Substanzen Senecionin /56/ und Seneciphyllin /58, 65/.

Unter der Voraussetzung, daß die spezifische Drehung konzentrationsunabhängig ist, läßt sich aus den Werten der optischen Drehung das Verhältnis Seneciphyllin / Senecionin nach folgender Formel berechnen.

$$a \cdot [\alpha_1]_D^{20} + b \cdot [\alpha_2]_D^{20} = [\alpha_3]_D^{20}$$

a = prozentualer Anteil Seneciphyllin im Gemisch

b = 1-a= prozentualer Anteil Senecionin im Gemisch

$[\alpha_1]_D^{20}$= spezifische Drehung für Seneciphyllin

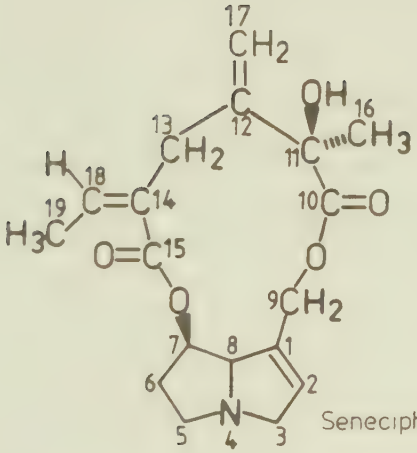
$[\alpha_2]_D^{20}$= spezifische Drehung für Senecionin

$[\alpha_3]_D^{20}$= spezifische Drehung für das Gemisch

Die in Ethanol gemessene optische Drehung beträgt für das Gemisch $[\alpha]_D^{20} = -86^o$ für Seneciphyllin $[\alpha]_D^{20} = -106^o$ und für Senecionin $[\alpha]_D^{20} = -71^o$ /66/. Aus diesen Werten läßt sich das Verhältnis Seneciphyllin / Senecionin zu 56,9% / 44,1% bestimmen.

/65/ H.J. Segall, J.L. Dallas; Phytochemistry 22, 1271 (1983)
/66/ E. Röder, H. Wiedenfeld, E.-J. Jost;
Planta Med. 44, 182 (1982)

Senecionin



Seneciphyllin

4.0 Senecio doria L.

4.1 Botanische Beschreibung und Fundort

Die Asteracee Senecio doria, fettblättriges Kreuzkraut, findet sich auf nassen Wiesen, an Seeufern, in Gräben oder feuchten Auwäldern, d.h. bei stehenden oder träge fließenden Gewässern. Sie ist in Spanien, Südfrankreich, Sizilien, Österreich und Rumänien verbreitet.

Die bis zu 1,50 m hohe Pflanze hat einen kahlen, schwach ästigen, aufrechten Stengel. Die Laubblätter sind bläulich - grün, kahl und ledrig, wobei die unteren eher elliptisch bis länglich ganzrandig oder gezähnt sind, während dann elliptische bis lanzettliche folgen. Am oberen Teil des Stengels gehen sie in kleine, eilanzettliche, hochblattähnliche Blätter über. Die 15 - 20 mm breiten Blütenköpfchen sind sehr zahlreich und bilden einen mehrfach zusammengesetzten reichästigen Strauß. Jedes Köpfchen ist mit zehn bis dreizehn Hüllblättern bestückt. Die goldgelben Blüten haben fünf bis sechs Zungenblüten. Die Achänen sind 3 mm lang und kahl. Der Pappus ist schmutzig - weiß und drei- bis viermal so lang wie die Frucht /45/.

Die oberirdischen Teile wurden an unterschiedlichen Orten während der Blütezeit im August 1983 in Ungarn in der Nähe von Budapest sowie in Rumänien bei Tirgues Mures, bei Hermannstadt, im Tartlauer Moor und im Bucegi - Gebirge gesammelt.

Die Droge wurde luftgetrocknet und in einer Drogenmühle pulverisiert.

4.2 Phytochemische Beschreibung

4.2.1 Extraktion

Die luftgetrockneten und gepulverten Drogen werden fünf Tage mit Methanol erschöpfend extrahiert und dann nach der unter Kap. 2.2.1 beschriebenen Methode aufgearbeitet.

4.2.2 Nachweis des Alkaloids

Die sechs RE werden dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Fließmittel dient eine Mischung von Dichlormethan/Methanol/Ammoniak konz. im Verhältnis 85:14:1. Die entwickelten Platten werden entsprechend der unter Kap. 2.2.2 beschriebenen Methode besprüht. In allen sechs Chargen kann sowohl mit Dragendorffs Reagens als auch mit der Dann - Mattocks'schen Probe ein Alkaloid mit dem Rf - Wert von 0,37 detektiert werden. Die dunkelblaue Farbe deutet auf ein Alkaloid mit einer ungesättigten Necinbase hin.

4.2.3 Auftrennung und Isolierung

Die bei Hermannstadt und im Tartlauer Moor gesammelten Proben dienen zur Isolierung des Alkaloids.

Zur Isolierung des Alkaloids wird die unter Kap. 3.2.3 beschriebene DCC - Chromatographie gewählt. Es wird im aufsteigenden Modus gearbeitet. Als Fließmittel dient Chloroform, Toluol, Methanol und Wasser im Verhältnis 5:5:7:2. Die gesammelten Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch untersucht. Das Alkaloid wird als hellgelbes Öl isoliert. Für die Strukturaufklärung werden IR-, Massen-, ^{1}H- und ^{13}C-NMR Spektren angefertigt.

4.3 Strukturaufklärung des Alkaloids 3

Das Alkaloid mit dem Rf - Wert von 0,37 fällt als ölige Substanz an. Verschiedene Kristallisationsversuche mit Aceton, Petrolether, n - Hexan, Ethanol, Dichlormethan und deren Mischungen blieben erfolglos. Die in Ethanol gemessene optische Drehung beträgt $[\alpha]_D^{20} = +6^\circ$.

Das IR-Spektrum in Abb. 22 zeigt bei 3400 cm^{-1} eine ausgeprägte Bande für die OH-Valenzschwingung. Bei 1740 cm^{-1} erkennt man die Carboxylbande für einen gesättigten und bei 1710 cm^{-1} für einen α, β - ungesättigten Ester. Deutlich tritt bei 1650 cm^{-1} die scharfe Bande für eine unsymmetrisch substituierte Doppelbindung auf.

Abb. 23 gibt das Massenspektrum des Alkaloids wieder. Dem Molekülpeak M^+ von 351 kann die Summenformel $C_{18}H_{25}NO_6$ zugeordnet werden. Im ionenstoßinduzierten Zerfall erfolgt eine $C_5H_6O_2$ - Spaltung. Dies entspricht einer Abspaltung eines Säurerestes. Somit handelt es sich um einen offenen Diester, dessen Säurekomponente jeweils eine Carbonsäure mit fünf Kohlenstoffatomen und einer OH-Funktion enthält. Weiterhin entsteht unter OH-Abspaltung das Fragment m/e 236. Da das vorliegende Pyrrolizidinalkaloid eine Doppelbindung in 1,2 - Stellung besitzt, muß der Zerfall am C-9 beginnen. Der Peak bei m/e 253 beweist, daß die geforderte OH-Gruppe in β-Stellung zum Ester vorliegt. Dieses Fragment ist nach Umlagerung und Esterspaltung entstanden, jedoch nicht durch eine Mc Lafferty-Umlagerung. Die Umlagerung ist in Abb. 24 wiedergegeben.

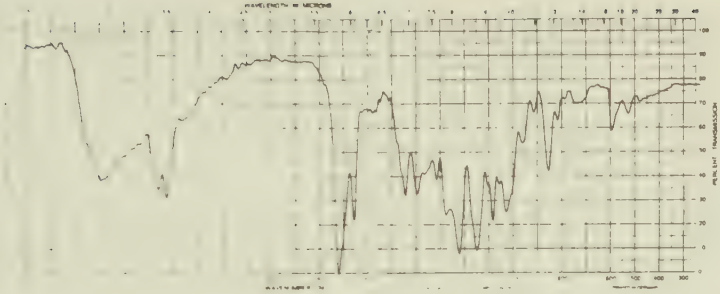


Abb. 22 IR-Spektrum des Alkaloids 3

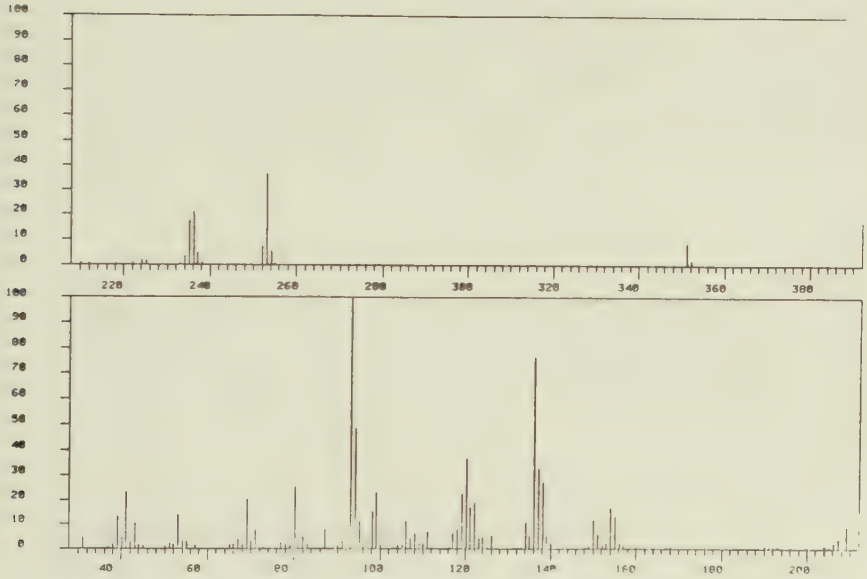


Abb. 23 Massenspektrum des Alkaloids 3

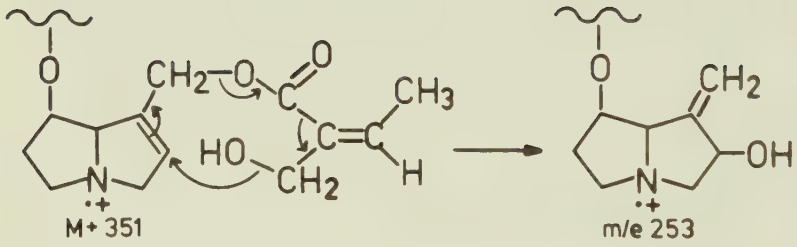


Abb. 24 Umlagerung u. Esterspaltung zum Fragment m/e 253

Das weniger intensive Fragment m/e 235 zeigt an, daß die angegebene Säurekomponente am C-7 steht, da hier eine Mc Lafferty-Umlagerung stattgefunden hat. Dies ist in Abb. 25 dargestellt.

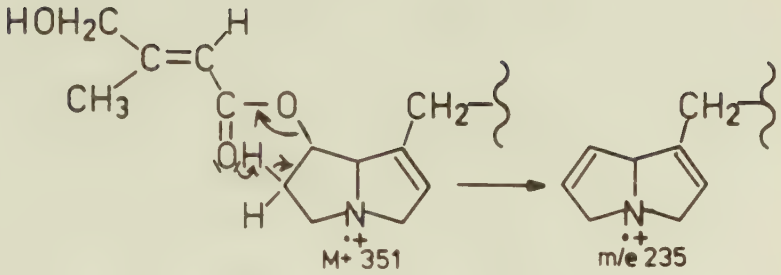


Abb. 25 Mc Lafferty-Umlagerung zum Fragment m/e 235

Das Fragment m/e 209 entsteht nach Ethinabspaltung aus m/e 235.

Die Fragmente 138, 137, 136, 126, 120, 119, 118, 108, 106, 94, 93 als Basepeak und 80 sind typisch für den Grundkörper Retronecin bzw. sein diastereomeres Heliotridin /49/.

Abb. 26 gibt das Zerfallsschema wieder.

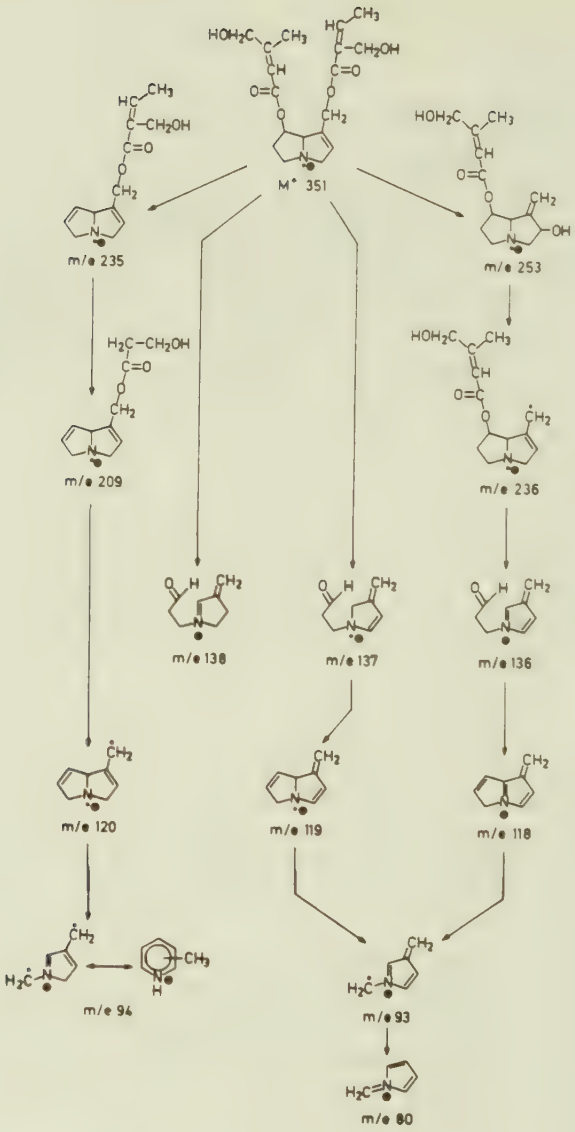


Abb. 26 Zerfallsschema des Alkaloids 3

Abb. 27 zeigt das ^{1}H-NMR Spektrum des Alkaloids. Das Singulett für die Methylenprotonen am C-9 zeigt, daß es sich um einen offenkettigen Diester handelt. Im Gegensatz zu den ringgeschlossenen Diestern besitzt das Kohlenstoffatom noch seine freie Drehbarkeit und bildet somit kein AB-System. Die Methylenprotonen am C-3 und C-5 sind magnetisch inäquivalent, wobei denen am C-3 wegen der Nachbarschaft zum elektronegativen Stickstoff und zur Doppelbindung der Tieffeldwert von 3,82 ppm zugeordnet werden kann. Die Methylenprotonen am C-5 geben ein Signal bei 3,33 ppm. Das Multiplett bei 2,62 ppm läßt sich den Methylenprotonen am C-6 zuordnen, wobei dieser Wert auf Retronecin als Grundkörper hindeutet.

Bei 6,33 ppm erkennt man das Signal für das Methinproton am C-17, das in ein Quartett mit einer Kopplungskonstante von J=7 Hz aufspaltet. Die Tieffeldverschiebung des olefinischen Protons deutet auf cis - Stellung zur Carboxylgruppe hin. Entsprechend weist die Methylgruppe am C-18 bei 1,9 ppm ein Dublett mit der Kopplungskonstante von J=7 Hz auf eine vicinale Kopplung zum C-17-H hin. Das Methinproton am C-11 zeigt ein verbreitertes Singulett bei 5,88 ppm. Die Methylprotonen am C-14 erscheinen bei 2,0 ppm als ein Dublett mit einer ^{4}J - Kopplung von 1 Hz zum C-11H, was die trans - Stellung von diesem Methinproton zur Methylgruppe C-14 anzeigt.

Durch D_2O - Austausch können die OH - Gruppen am C-13 und C-19 bei 4,57 ppm deutlich gemacht werden.

Die Nachbarschaft zur Carboxylgruppe am C-15 bewirkt bei den Methylenprotonen am C-19 eine Verschiebung zu 4,17 ppm. Damit kann den Protonen am C-13 der Wert von 4,03 ppm zugewiesen werden.

Die Zuordnung der Werte ist in Tab. 6 aufgeführt.

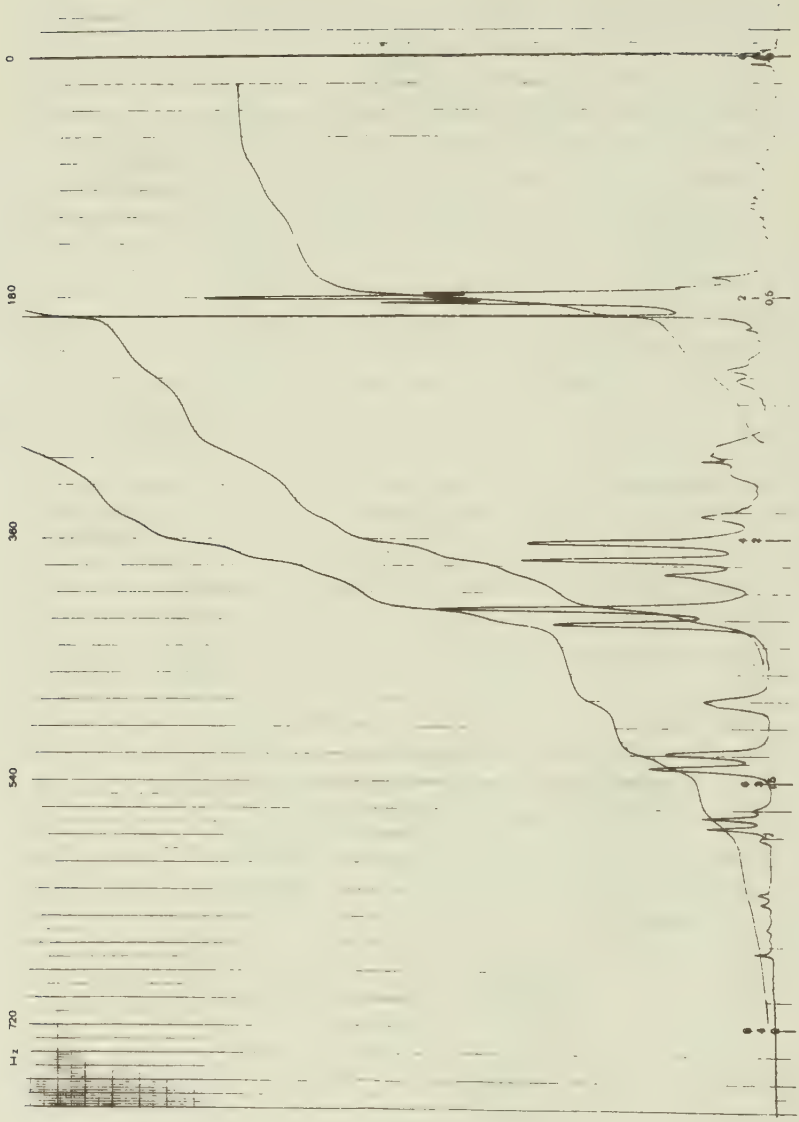


Abb. 27 ^{1}H-NMR Spektrum des Alkaloids 3

Tab. 6 ^{1}H-NMR Daten des Alkaloids 3

Protonen am Kohlenstoffatom	ppm		Anzahl H		J
C-17	6,33	q	2H		7Hz
C-11	5,88	s	1H		
C- 2	5,76	m	1H		
C- 7	5,34	m	1H		
C- 9	4,71	s	2H		
C-13-OH	4,57	s	1H	D_2O Austausch	
C-17-OH	4,57	s	1H	D_2O Austausch	
C- 8	4,29		1H		
C-19	4,17		3H		
C-13	4,03		2H		
C- 3	3,82	m	2H		
C- 5	3,33	m	2H		
C- 6	2,62		2H		
C-14	2,00	d	3H		1Hz
C-18	1,97	d	1H		7Hz

Abb. 28 zeigt das ^{13}C - NMR Spektrum, wobei die Zuordnung der Peaks durch die Interpretation von entkoppelten und gekoppelten Spektren erfolgt.

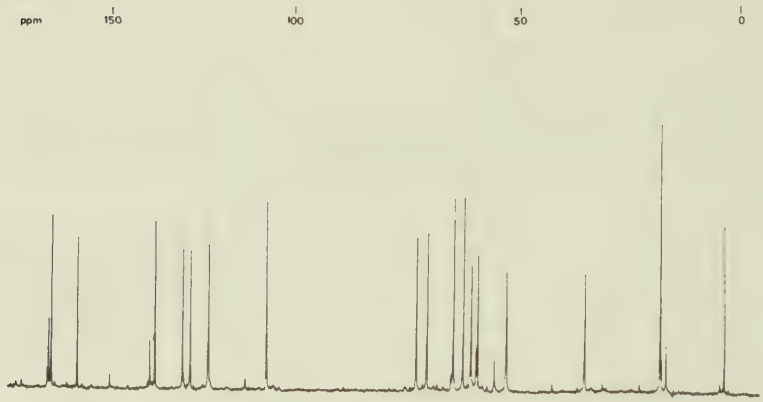


Abb. 28 ^{13}C-NMR Spektrum des Alkaloids 3

Die Carboxylkohlenstoffe sind am weitesten ins Tieffeld verschoben und zeigen ein Signal bei 165, 9 ppm. Ähnlich wie im ^{1}H - NMR Spektrum ist auch im ^{13}C - NMR Spektrum wegen der Nachbarschaft zum elektonegativen Stickstoff und zur Doppelbindung der Kohlenstoff C-3 gegenüber denen des C-5 und C-6 ins tiefere Feld verschoben, so daß ihm der Wert von 62, 27 ppm, C-5 auf Grund der Nachbarschaft zum Stickstoff der Wert von 53, 6 ppm zuzuordnen ist. C-6 kommt der Wert von 34, 3 ppm zu. An Hand des gekoppelten Spektrums erfolgt die Zuordnung des Wertes 127, 3 ppm zum C-2 und 133, 6 ppm zum C-1. Hervorzuheben ist die Verschiebung der quartären Kohlenstoffatome C-12 und C-16. Dem

Kohlenstoff C-16 kommt wegen seiner Bindung zur Hydroxymethylengruppe und zur Carboxylgruppe der Wert von 159, 57 ppm zu. Der Kohlenstoff C-12 zeigt ein Signal bei 131, 76 ppm. Die beiden Methylkohlenstoffe am C-14 und C-19 geben ein Signal bei 15, 79 bzw. 15, 73 ppm. Die Zuordnungen der Hydroxymethylenkohlenstoffe C-13 und C-19 erfolgen über die gekoppelten Spektren. So geht C-13 eine ^{3}J - Kopplung sowohl zum C-14-H_3 als auch zum C-11-H_1 ein. Ihm wird daher der Wert von 66, 6 ppm zugeordnet. C-19 zeigt eine ^{3}J - Kopplung zum C-17-H_1 und eine ^{4}J -Kopplung zum C-18-H_3, so daß ihm der Wert von 64, 2 ppm zugewiesen wird.

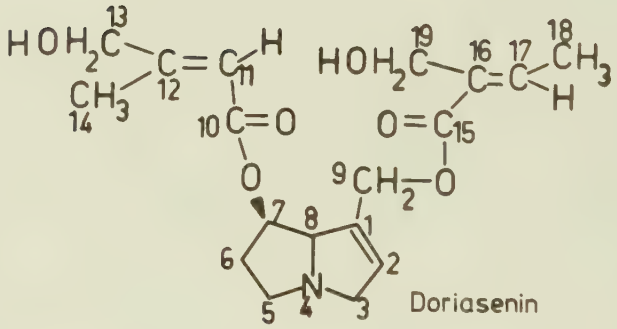
Die Werte sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tab. 7 ^{13}C-NMR Daten des Alkaloids 3

Kohlenstoff	ppm	Kohlenstoff	ppm
C-18	15, 73	C- 8	75, 67
C-14	15, 79	C-11	112, 89
C- 6	34, 34	C- 2	127, 30
C- 5	53, 60	C-12	131, 76
C- 9	60, 56	C- 1	133, 67
C- 3	62, 27	C-17	140, 54
C-19	64, 25	C-16	159, 57
C-13	66, 67	C-15	165, 98
C- 7	73, 05	C-10	166, 57

Das Alkaloid wird nach Interpretation aller spektroskopischen Daten als O^9 - sarracinyl - O^7 - hydroxysenecioyl - retronecin identifiziert.

Für dieses in der Literatur noch nicht beschriebene Alkaloid wird der Name DORIASENIN vorgeschlagen.



Doriasenin

4.4 Quantitative Bestimmung des Alkaloids unter Standortberücksichtigung

Der Alkaloidgehalt der verschiedenen Chargen wird bestimmt, um Rückschlüsse zwischen Alkaloidverteilung einerseits und geobotanischen Aspekten andererseits zu ziehen.

Hierzu werden von sämtlichen Drogenchargen der verschiedenen Standorte jeweils die RE unter identischen Bedingungen hergestellt (siehe Kap. 4.2).

Einen ersten Hinweis auf unterschiedliche Alkaloidkonzentrationen liefern die verschiedenen Ausbeuten an Extrakten bezogen auf die gepulverte Droge. Die quantitative Bestimmung erfolgt densitometrisch. Als Eichkurve dient eine Stammlösung des reinen Alkaloids. Von den Rohextrakten werden ebenfalls Stammlösungen angefertigt und zu den Eichlösungen aufgetragen. Bei den so präparierten Platten wird nach der Entwicklung die Extinktion bei 254 nm im UV gemessen. In den graphisch vorliegenden Meßkurven werden die Halbwertsbreiten der Kurven bestimmt.

Aus den Eichlösungen erhält man durch Auftragen der Halbwertsbreiten gegen die Konzentration im logarithmischen Maßstab die Eichgerade. Die jeweiligen Konzentrationen der Proben lassen sich durch Eintragen der Meßwerte an der Eichgeraden ablesen.

Die Werte sind in Tab. 8 aufgelistet.

Tab. 8

Standort	Land	RE in %	Alkaloidkonzentration in %
Tirgues Mures '82	Ro	0,15	0,14
Tigues Mures '83	Ro	0,27	0,19
Hermannstadt	Ro	0,31	0,22
Budapest	H	0,47	0,35
Tartlauer Moor	Ro	0,04	0,027
Bucegi Gebirge	Ro	0,08	0,06

Anschließend werden die DC - Platten der Dann - Mattocks'schen Probe unterzogen und die gefärbten Zonen bei 564 nm ein zweites Mal densitometrisch untersucht. Die hier erhaltenen Werte stimmen mit denen der UV-Messung überein.

Auffällig ist der unterschiedliche Alkaloidgehalt der Proben. Die im Tartlauer Moor bzw. im Hochgebirge gesammelten Drogen weisen einen wesentlich niedrigeren Alkaloidgehalt auf als die bei stadtnahem Kulturland gesammelten. Die bei Tirgues Mures 1982 und 1983 gesammelten Pflanzen zeigen nur eine geringe Änderung in der Alkaloidkonzentration.

Dies gibt einen Hinweis darauf, daß hochgelegene Standorte bei der vorliegenden Spezies eine niedrige Alkaloidkonzentration zur Folge hat. Ebenfalls niedrige Werte sind bei der Probe aus dem Hochmoorgebiet zu finden. Dies deutet darauf hin, daß unterschiedliche Bodenbeschaffenheit bzw. hier die Salzkonzentration und Intensität der UV-Strahlen den Alkaloidgehalt maßgeblich beeinflussen.

5.0 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Isolierung und Strukturaufklärung von Pyrrolizidinalkaloide aus Senecio rupestris Waldst. u. Kit., Senecio paludosus, ssp tomentosus L. und Senecio doria L. sowie der Synthese eines Metaboliten des Senecionins. Die Strukturaufklärung erfolgt durch IR-, Massen-, ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR Spektroskopie.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Senecio rupestris Waldst. u. Kit. enthält das Isomerenpaar Senecionin und Integerrimin im Verhältnis 75,1% / 24,9% .
- Senecio paludosus, ssp tomentosus L. enthält die Pyrrolizidinalkaloide Seneciphyllin und Senecionin im Verhältnis 55,9% / 44,1% .
- Aus Senecio doria L. wurde ein neues, in der Literatur noch nicht beschriebenes Pyrrolizidinalkaloid isoliert, dem die Struktur des O^{9} - sarracinyl- O^{7} - hydroxysenecioyl - retronecins zukommt. Für dieses Alkaloid wird der Name DORIASENIN vorgeschlagen.
- Von Senecio doria L. verschiedener Herkunft wurde eine densitometrische Gehaltsbestimmung für Doriasenin durchgeführt.
- Ausgehend vom Pyrrolizidinalkaloid Senecionin wurde Dehydroretronecin synthetisiert.

6.0 Experimenteller Teil

Zur Dünnschichtchromatographie werden Kieselgel-Fertigplatten (Kieselgel 60, F_{254}, Schichtdicke 0,25 mm) der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Als Fließmittel dient ein Gemisch aus $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_3$ (25%) im Verhältnis 85:14:1. Als Auftragegerät wird ein Linomat der Fa. Camag, Muttenz, mit einer 100 µl bzw. 500 µl Hamilton-Spritze verwendet.

Zur Detektion mit Dragendorff's Reagenz werden verwendet:

Dragendorff 1:	Wismutnitrat	0,85 g
	Essigsäure	10,00 ml
	Wasser	40,00 ml
Dragendorff 2:	Kaliumjodid	8,00 g
	Wasser	20,00 ml

Die Lösungen 1 und 2 werden bei Bedarf zu gleichen Teilen gemischt.

Bei der Detektion nach Dann und Mattocks werden folgende Reagenzien verwendet:

1. Wasserstoffperoxid:	H_2O_2 30%	
2. Acetanhydrid Reagenz:	Acetanhydrid	1 Teil
	Benzin (80-100°C)	4 Teile
	Toluol	5 Teile
3. Ehrlichs Reagenz:	p-Dimethylamino-benzaldehyd	2,00 g
	Salzsäure 37%	54,00 ml
	Ethanol 90%	ad 100,00 ml

Zur Säulenchromatographie bei Normaldruck wird eine 2,30 m lange Glassäule (Durchmesser 1 cm) verwendet. Als stationäre Phase dient Kieselgel 60 (Korngröße 0,063 - 0,200 mm) der Fa. Merck, Darmstadt.

Fließmittel : CH_2Cl_2/CH_3OH 92:8

Aus 100 mg Alkaloidgemisch werden 3,7 mg Senecionin und 2,7 mg Integerrimin isoliert.

Bei der Niederdrucksäulen - Chromatographie wird als stationäre Phase Kieselgel 60 (Korngrößenbereich 0,040 - 0,063 mm) verwendet, das trocken in die Glassäule gefüllt und dann mit dem entsprechenden Fließmittel konditioniert wird.

Bedingungen zur Niederdrucksäulenchromatographie

Säulendruck: 5 - 6 bar
Probenvolumen: 10 ml
Säulenmaß: 15 cm x 7 cm

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgt auf dem Spektrometer IR-20A der Fa. Beckmann, München. Festsubstanzen werden als KBr-Presslinge, ölige Substanzen als KBr-Filme vermessen.

Die ^{1}H-NMR-Spektren der Alkaloide werden auf einem Spektrometer WH 90, 90 MHz der Fa. Bruker, Karlsruhe, aufgenommen, Lösungsmittel ist $CDCl_3$. Der Austausch erfolgt mit D_2O. TMS dient als innerer Standard.

Die Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren erfolgt auf dem Bruker WH 90, 22,63 MHz. Als Lösungsmittel dient $CDCl_3$, als innerer Standard TMS.

Die Massenspektren werden bei einer Emission von 70 eV und einer Quellentemperatur von 180°C auf einem MS 50 der Fa. A.E.I., Brunner, angefertigt.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert auf einem Kofler-Mikroskopgerät der Fa. Reichert, Wien.

Die DCC-Chromatographie wird auf dem Gerät B-670 der Fa. Büchi, Eislingen/Fils, durchgeführt.

Fließmittel zur DCCC : $CHCL_3$/Toluol/CH_3OH/H_2O
5:5:7:2

Detektion : DC-Analyse ; Dann - Mattocks'sche Probe

Die Bestimmung der optischen Drehung erfogt auf einem Polarimeter 241 der Fa. Perkin-Elmer, Vaterstetten.

Die GC-Untersuchungen werden auf einem Gaschromatographen Typ 3700 der Fa. Varian, Darmstadt, durchgeführt.

Säule: Kapillarsäule WCDT-Quarzkapillare mit der flüssigen Phase SE 30; 25m Länge; Innendurchmesser 0,2 mm; Filmdicke 0,2 µm

Injektortemperatur: 280°C

Detektortemperatur: 280°C

Trägergas: Helium mit 3,5 bar Vordruck

Spliteinstellung: 12 ml/min

Brenngas: synthetische Luft mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 30 ml/min

Make up Gas zur Umspülung des Detektors: Stickstoff

Anfangstemperatur: 180°C 5 min isotherm gehalten

Aufheizphase: 10°C/min

Endtemperatur: 250°C 5 min isotherm gehalten

Die GC/MS-Analyse wird auf einer GC/MS Kombination 1020 B der Fa. Finningan/MAT, Bremen, unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

GC-Teil Typ Sigma 3B der Fa. Perkin - Elmer, Überlingen

Säule: Kapillarsäule; J. inc. Fused silica; 30 m lang; 0,25 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke; Trennphase SE-30

Trägergas H_2; Säulenvordruck 12 psi; ϑ =40 cm/sec

Injektion: Splitinjektion; 1 µl; Splitverhältnis 1:15

Anfangstemperatur: 150°C

Endtemperatur: 250°C

Aufheizzeit: 10°C/min

MS-Teil Quadropol - Gerät bis Masse 800 der Fa. Finnigan/MAT, Bremen

Ionisierungsenergie 70 eV, Multipliersspannung 2000 V

Quellentemperatur 180°C

Kopplung: direkt

Separatorofentemperatur: 290°C

Versuchsbeschreibung zur Synthese des Dehydroretronecins

0,070 g (0,208 mmol) Senecionin, in 10 ml CH_2Cl_2 gelöst, werden mit einer Lösung von 0,080 g (0,463 mmol) m-Chlorperbenzoesäure in 10 ml CH_2Cl_2 unter Eiskühlung 16 Std. gerührt. Die überschüssige Persäure wird mit MnO_2 entfernt. Das Filtrat reagiert unter Stickstoffbegasung mit dem Acetylierungsgemisch Acetanhydrid/Pyridin (1,00 g Acetanhydrid in 5,00 ml Pyridin) 45 min bei Raumtemperatur. Das Reaktionsgemisch wird mit Eiswasser versetzt und die organische Phase abgetrennt. Diese wird auf eine 15 cm lange Niederdrucksäule aufgetragen.

Als Fließmittel dienen CH_2Cl_2: 300 ml

CH_2Cl_2/CH_3OH 95:5 300 ml

CH_2Cl_2/CH_3OH 90:10 300 ml

CH_3OH 300 ml

Es werden Fraktionen von 20 ml aufgefangen und mit Hilfe der DC untersucht. Die Detektion erfolgt mit Ehrlichs Reagenz.

Es werden 0,010 g (14% d. Theorie) Dehydroretronecin isoliert.

Die densitometrische Alkaloidbestimmung:

5,60 mg Doriasenin werden in 2 ml CH_2Cl_2 gelöst und von dieser Stammlösung mit Hilfe des Linomaten 10 µl, 25 µl und 30 µl auf eine Breite von 1 cm auf eine Kieselgel-Fertigplatte aufgetragen. Ebenso werden von den Rohextrakten Stammlösungen angefertigt. Davon werden 10 µl und 20 µl, wie oben beschrieben, auf die DC-Platte aufgetragen. Als Fließmittel dient $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_3$ (25%) im Verhältnis 85:14:1.

Die entwickelten Platten werden bei 254 nm auf einem PMQ 3 Spektrometer der Fa. Zeiss, Oberkochen, vermessen.

Abb. 27 gibt die Eichkurve wieder. Die Alkaloidkonzentrationen für die verschiedenen Proben sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tab. 9

Ort	aufgetragene Menge	Halbwerts-breite	Konz. nach der Eichkurve
T. M 83	0, 107 mg	0, 18 cm	0, 074 mg
	0, 053 mg	0, 12 cm	0, 038 mg
T. M. 82	0, 100 mg	0, 20 cm	0, 091 mg
	0, 050 mg	0, 14 cm	0, 046 mg
Hermann-	0, 14 mg	0, 21 cm	0, 100 mg
stadt	0, 07 mg	0, 15 cm	0, 052 mg
Budapest	0, 136 mg	0, 21 cm	0, 100 mg
	0, 068 mg	0, 15 cm	0, 052 mg
Tartlau	0, 110 mg	0, 18 cm	0, 074 mg
	0, 055 mg	0, 12 cm	0, 038 mg
Bucegi Geb.	0, 110 mg	0, 19 cm	0, 085 mg
	0, 055 mg	0, 13 cm	0, 042 mg

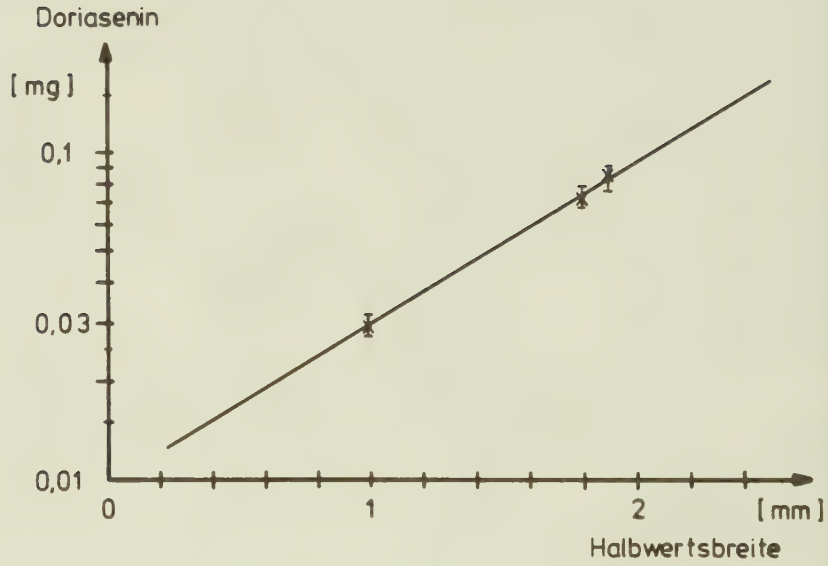


Abb. 29 Eichkurve zur densitometrischen Bestimmung von Doriasenin

7.0 Literaturliste

/1/ A. Müller; Heil- und Gewürzpflanzen 7, 8 (1924)

/2/ Neu vollkommentlich Kreuterbuch des J. T. Tabernaemontanus, Hoffermann Frankfurt S. 477 (1612)

/3/ E. Schmidt; Zahnärztl. Praxis 4, 16 (1953)

/4/ W. Klatt; Zahnärztl. Rundschau 62, 20 (1953)

/5/ E. Röder; Nebenwirkungen v. Heilpflanzen Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 41 (1982)

/6/ B. Manstein; Zentralbibl. Gynaekol. 42, 1672 (1953)

/7/ H.F. Watt; J. Chem. Soc. 95, 466 (1909)

/8/ L.B. Bull, C.C.J. Culvenor, A.T. Dick; The Pyrrolizidine Alkaloids North Holland Company, Amsterdam (1968)

/9/ E. Röder; Pharm. Unserer Zeit 13, 2 (1984)

/10/ L.W. Smith, C.C.J. Culvenor; J. Natural Products 44, 2 (1981)

/11/ D.J. Robins; In Progress of the Chemistry of Organic Products Founded by L. Zechmeister Ed. W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby Springer Verlag Wien u. New York Vol. 41, 115ff (1982)

/12/ W.H. Pethick; Rept. Vet. Director General Dep. Agri. for 1905 Can. 90 (1906)

/13/ W.H. Chase; Agri. J. Cape Good Hope 25, 675 (1904)

/14/ L. Van Es, J.R. Cantwell, H.M. Martin, J. Kramer; Agri. Exptl. Station Res. Bull 43 (1929)

/15/ A.R. Cushny; J. Pharmacol. Exp. Ther. 2, 531 (1911)

/16/ D.R. Svoboda, J.K. Reddy; Cancer Res. 32, 908 (1972)

/17/ P.N. Harris, K.K. Chen; Cancer Res. 30, 2881 (1970)

/18/ P.T. Hooper, W.A. Scanlan; Aust. Vet. J. 53, 109 (1977)

/19/ D.A. Passll, G.G. Hogg, R.G. Russel, J.A. Edgar, J.M. Tence, L. Rikard-Bell; Aust. Vet. J. 55, 284 (1979)

/20/ Schweiz. Gesellschaft für Pathologie (Vereinsbericht 1980); Schweiz. Med. Wochenschr. 111, 908 (1981)

/21/ E.K. Mc Lean; Pharmacol. Rev. 22, 429 (1970)

/22/ R. Huxtable, A. Stillman, D. Ciaramitaro; Proc. West. Pharmacol. Soc. 19, 181 (1977)

/23/ H. D. Tandon, B. N. Tandon, A. R. Mattocks;
Am. J. Gastroenterol. 70, 607 (1978)

/24/ G. Bras, D. B. Jellilife, K. L. Stuart;
Arch. Pathol. 57, 285 (1954)

/25/ B. N. Tandon, R. K. Tandon, J. N. Tandon, M. Narndranathan, Y. K. Joshi; Lancet 7, 271 (1976)

/26/ A. E. Johnson, J. R. Molyneux, G. B. Merril;
J. Agric. Food Chem. 33, 50 (1985)

/27/ A. Stillman, A. R. Huxtable, P. Consroe, P. Kohnen, S. Smith; Gastroenterlogy 73, 349 (1977)

/28/ J. N. Roitman; Lancet 25, 944 (1981)

/29/ R. J. Huxtable; Gen. Pharmacol. 10, 159 (1979)

/30/ M. L. Deinzer, P. A. Thomson, D. M. Burgett, D. L. Isaacson; Science (Washington) 195, 497 (1977)

/31/ J. O. Dickinson, M. P. Cooke, R. R. King, P. A. Mohamed; J. Am. Vet. Med. Ascoc. 169, 1192 (1976)

/32/ M. L. Deinzer, B. L. Arbogast, D. R. Buhler, P. R. Cheeke; Anal. Chem. 54, 1811 (1982)

/33/ A. E. Johnson; Am. J. Vet. Res. 37, 107 (1976)

/34/ R. Adams, T. R. Govindachari;
J. Am. Chem. Soc. 71, 1180 (1949)

/35/ A. R. Mattocks; Chem. Biol. Interact. 5, 227 (1972)

/36/ R. Schoental; Nature (London) 179, 361 (1957)

/37/ C. C. J. Culvenor, J. A. Edgar, L. W. Smith, M. V. Jago, J. E. Peterson; Nature (London) New Biol. 229, 255 (1971)

/38/ A. R. Mattocks; Nature (London) 217, 723 (1968)

/39/ C. C. J. Culvenor, M. V. Jago; Carcinogenic Plant Products and DNA in "Chemical Carcinogens and DNA"
(Ed. P. L. Grover)
Vol. 1, 161 (1979) CRC Press, Boca Raton, Florida

/40/ A. R. Mattocks; Phytochemical Ecology
Ed. J. B. Harborne; Annual Proceeding of the Phytochemical Society Nr. 8, 179ff
Academic Press London and New York (1972)

/41/ M. Lafranconi, R. J. Huxtable;
Rev. Drug Metabol. Drug Interact. 3, 271 (1981)

/42/ C.C.J. Culvenor, L.W. Smith;
Tetrahedron Lett. 41, 3603 (1969)

/43/ J.O. Dickinson;
Food and Drug Administration (Washington)
Bur. Vet. Med. FDA/BVM Bd. 132, 45ff (1980)

/44/ H.J. Segall, D.W. Wilson, J.L. Dallas, W.F. Haddon;
Science 229, 472 (1985)

/45/ Flora Europaea Bd. 4
Cambridge University Press (1976/77)

/46/ E. Röder, H. Wiedenfeld;
Phytochemistry 16, 1462 (1977)

/47/ A.T. Dann; Nature (London) 186, 1015 (1960)

/48/ A.R. Mattocks; J. Chromatogr. 27, 505 (1967)

/49/ B. Hesse; Alkaloide, Fortschritt der Massenspektroskopie
3, 229 Verlag Chemie, Weinheim (1975)

/50/ C.C.J. Culvenor, M.L. Hefernan, W.G. Woods;
Aust. J. Chem. 18, 1605 (1965)

/51/ L.B. Bull, C.C.J. Culvenor, A.T. Watt;
The Pyrrolizidine Alkaloids, North Holland Publishing
Company, Amsterdam S. 48 (1968)

/52/ E. Breitmaier, W. Voelter; ^{13}C-NMR - Spektroskopy,
Verlag Chemie, Weinheim (1978)

/53/ R.J. Molyneux, J.N. Roitman, M. Benson, R.E. Lundin;
Phytochemistry 21, 439 (1982)

/54/ H. Casal, J. Altamirano, P. Moyna;
Gazz. Chim. Ital. 107, 361 (1977)

/55/ S.E. Drewes, J. Antonowitz, P.T. Kaye;
J. C. S. Perkin I, 287 (1981)

/56/ H. Wiedenfeld, E. Röder; Phytochemistry 18, 1083 (1979)

/57/ C.C.J. Culvenor, W.G. Woods;
Aust. J. Chem. 18, 1625 (1965)

/58/ H.J. Jones, C.C.J. Culvenor, L.W. Smith;
Aust. J. Chem. 35, 1173 (1982)

/59/ M.A. Stahmann, M. Bergmann; J. Org. Chem. 11, 586 (1946)

/60/ J. Cymerman Craig, K. K. Purushothaman
J. Org. Chem. 35, 1721 (1970)

/61/ C. C. J. Culvenor, J. A. Edgar, L. W. Smith, H. J. Tweeddale
Aust. J. Chem 23, 1853 (1970)

/62/ K. Hostettmann;
Chemie f. Labor u. Betrieb 32, 211 (1981)

/63/ Büchi Laboratoriums Technik GmbH
DCCC - Information 1, 14 (1983)

/64/ M. Hesse, M. Meier, B. Zeeh;
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1979)

/65/ E. Röder, H. Wiedenfeld, E.-J. Jost;
Planta Med. 44, 182 (1982)

/66/ H. J. Segall, J. L. Dallas; Phytochemistry 22, 1271 (1983)

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn (Bonn - Endenich) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Röder im November 1982 begonnen und im August 1985 beendet.

Herrn Prof. Dr. G. Rücker danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. H. Heltmann, Universität Bonn, danke ich für seine Hilfe bei der Beschaffung des Pflanzenmaterials.

Herrn Dr. H. Wiedenfeld danke ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine großzügige Unterstützung bei dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Röder, der durch stete Ratschläge und wertvollen Hinweisen die vorliegende Dissertation förderte.

LEBENSLAUF

27. 3. 1959	Geboren in Oberhausen Mutter: Irmgard Pfitzer geb. Schweitzer Vater: Dr. Franz Pfitzer, Chemiker
1965 - 1968	Besuch der Hirschkamp-Volksschule in Oberhausen-Sterkrade-Nord
1968 - 1977	Besuch des Sophie-Scholl-Gymnasiums in Oberhausen-Sterkrade
14. 7. 1977	Abitur am Sophie-Scholl-Gymnasium
WS 1977/78 - SS 1978	Beginn des Studiums der Pharmazie in Regensburg
WS 1978/79 - SS 1981	Fortsetzung des Studiums der Pharmazie in Bonn
27. 3. 1980	Erstes Staatsexamen
30. 9. 1981	Zweites Staatsexamen
1. 10. 1981 - 30. 9. 1982	Praktikum in der Linden Apotheke, Bonn
4. 10. 1982	Drittes Staatsexamen
1. 11. 1982	Beginn der vorliegenden Dissertation am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn (Bonn-Endenich) unter der Leitung von Prof. Dr. E. Röder; gleichzeitig Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin
23. 11. 1982	Erteilung der Approbation als Apothekerin